

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

To:

Agent:
Mr. KUZUWA, Kiyoshi
Address:
KUZUWA & PARTNER,
AOI Bldg., 19 Honshio-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 160-0003 JAPAN

Date of Mailing
(day/month/year) 29. 05. 01

Applicant's or agent's file reference

PCT-1741/KJ

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/JP00/03639

International filing date (day/month/year)

05. 06. 00

Priority Date (day/month/year)

04. 06. 99

Applicant

KAJI, AKIRA

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/
Japanese Patent Office (IPEA/JP)
4-3, Kasumigaseki 3-chome,
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Facsimile No.

Authorized Officer

Commissioner of the Patent Office

Telephone No. 03-3581-1101 (3448)



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 05 February 2001 (05.02.01)	
International application No. PCT/JP00/03639	Applicant's or agent's file reference PCT-1741/KJ
International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)	Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
Applicant KAJI, Akira et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 December 2000 (27.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Christelle Croci
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KUZUWA, Kiyoshi
Patent Attorneys, Kuzuwa & Partners
AOI Building
19, Honshio-cho
Shinjuku-ku
Tokyo 160-0003
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 05 February 2001 (05.02.01)		
Applicant's or agent's file reference PCT-1741/KJ		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/03639	International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)	
		Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
Applicant KAJI, Akira et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : JP, KR, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Christelle Croci Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KUZUWA, Kiyoshi
Patent Attorneys, Kuzuwa & Partners
AOI Building
19, Honshio-cho
Shinjuku-ku
Tokyo 160-0003
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 14 December 2000 (14.12.00)		
Applicant's or agent's file reference PCT-1741/KJ		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/03639	International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)	Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
Applicant KAJI, Akira et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
14 December 2000 (14.12.00) under No. WO 00/75182

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

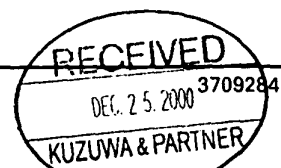
Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> Telephone No. (41-22) 338.83.38
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Form PCT/IB/308 (July 1996)



PATENT COOPERATION TREATY

5

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))



To:

KUZUWA, Kiyoshi
Patent Attorneys, Kuzuwa & Partner
Sogo Kojimachi Dai-ichi Bldg.
2, Kojimachi 3-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0083
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 05 July 2000 (05.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PCT-1741/KJ	International application No. PCT/JP00/03639

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

KAJI, Akira (all designated States)
LILJAS, Anders (for US)

International filing date : 05 June 2000 (05.06.00)
Priority date(s) claimed : 04 June 1999 (04.06.99)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 16 June 2000 (16.06.00)
List of designated Offices :

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
National : JP, US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Susumu Kubo
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.



PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

09/980954

International Application No.

International Filing Date

09/980954

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference

(if desired) (12 characters maximum) PCT-1741/KJ

Box No. I TITLE OF INVENTION

CRYSTAL OF RIBOSOMAL RECYCLING FACTOR (RRF) PROTEIN AND APPLICATION THEREOF ON THE BASIS OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURAL DATA OBTAINED FROM THE CRYSTAL

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KAJI, Akira

1-9, Daimoncho 1-chome, Higashikurume-shi,
TOKYO 203-0011 JAPAN

☒ This person is also inventor.

Telephone No.

0424-75-5973

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

JAPAN

State (that is, country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

☒ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LILJAS, Anders

Box 124, Department of Biophysics,
Lund University, S-221, Lund, SWEDEN

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SWEDEN

State (that is, country) of residence:

SWEDEN

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☐ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

KUZUWA, Kiyoshi (10284), patent attorney
NIIZUMA, Yo (11311), patent attorney
Patent Attorneys, KUZUWA & PARTNER,
Sogo Kojimachi Dai-ichi Bldg., 2, Kojimachi
3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083 JAPAN

Telephone No.

03-3265-9649

Facsimile No.

03-3265-9641

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.



Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☐ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input type="checkbox"/> IN India | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐
- ☐
- ☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



1



Box No. VI PRIORITY CLAIM					<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:			
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office	
item (1) 04. 06. 99	Patent Appln. 11-158637	JP			
item (2)					
item (3)					
<input checked="" type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)					
<small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</small>					
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY					
Choice of International Searching Authority (ISA) <small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</small>		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):			
ISA / JP		Date (day/month/year)	Number	Country (or regional Office)	
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING					
This international application contains the following number of sheets: request : 3 description (excluding sequence listing part) : 97 claims : 4 abstract : 1 drawings : 8 sequence listing part of description : 2 Total number of sheets : 115		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): <small>Petition, Document informing such as the record format of FDs.</small>			
Figure of the drawings which should accompany the abstract: Fig. 3		Language of filing of the international application:			
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT					
<small>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</small>					
KUZUWA, Kiyoshi (seal) NIZUMA, Yo (seal)					

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	
6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:





P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PCT-1741/KJ	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/03639	国際出願日 (日.月.年) 05.06.00	優先日 (日.月.年) 04.06.99
出願人(氏名又は名称) 梶 昭		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 3 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07K 14/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07K 14/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WIP(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Nelson, K. E. et al. "Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of <i>Thermotoga maritima</i> ", NATURE (May, 1999) Vol. 399, No. 6734 P. 323-329	1-51
X	WO, 98/37202, A1 (KAJI, Akira) 27.8月. 1998 (27.08.98) ファミリーなし	1-51

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
28.08.00

国際調査報告の発送日
05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
六笠 紀子

印

4 B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Kanai, T. et al. "A regulatory factor, Fillp, involved in derepression of the isocitrate lyase gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Eur. J. Biochem. (1998) Vol. 256, No. 1 P. 212-220	1-51
P, X	Selmer, M. et al. "Crystal structure of <i>Thermotoga maritima</i> ribosome recycling factor: A tRNA mimic", SCIENCE (Dec. 1999) Vol. 286 P. 2349-2352	1-51
P, X	Selmer, M. et al. "Crystallization and preliminary X-ray analysis of <i>Thermotoga maritima</i> ribosome recycling factor", Acta Cryst. (Dec. 1999) Vol. 55, No. 12 P. 2049-2050	1-51
P, X	JP, 2000-86696, A (梶 昭) 28. 3月. 2000 (28. 03. 00) ファミリーなし	1-51
P, X	JP, 2000-157275, A (中村 義一) 13. 6月. 2000 (13. 06. 00) ファミリーなし	1-51
P, A	Yun, J. et al. "Crystallization and preliminary crystallographic studies of ribosome recycling factor from <i>Escherichia coli</i> ", Acta Cryst. (Jan. 2000) Vol. 56, No. 1 P. 84-85	1-51
P, A	Kashimori, H. et al. "Letter to the Editor: Backbone NMR assignment and secondary structure of Ribosome Recycling Factor (RRF) from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ", Journal of Biomolecular NMR (Dec. 1999) Vol. 15, No. 4 P. 341-342	1-51

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

<p>出願人代理人</p> <p>葛和 清司</p> <p>あて名 〒 160-0003 東京都新宿区本塩町19番地 AOIビル 葛和国际特許事務所</p> <p>股</p>		<p>PCT</p> <p>国際予備審査報告の送付の通知書</p> <p>(法施行規則第57条) [PCT規則71.1]</p> <p>発送日 (日.月.年) 29.05.01</p>	
<p>出願人又は代理人 の書類記号 PCT-1741/KJ</p>		<p>重要な通知</p>	
<p>国際出願番号 PCT/JP00/03639</p>	<p>国際出願日 (日.月.年) 05.06.00</p>	<p>優先日 (日.月.年) 04.06.99</p>	
<p>出願人（氏名又は名称） 梶 昭</p> <p>1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。</p> <p>2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。</p> <p>3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。</p> <p>4. 注 意</p> <p>出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。</p> <p>国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。</p> <p>この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。</p> <p>選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。</p>			
<p>名称及びあて名 日本国特許庁（IPEA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>権限のある職員 特 許 庁 長 官</p>	<p>4B 2936</p>
		<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	

注 意

1. 文献の写しの請求について
国際予備審査報告に記載された文献であつて国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

- (1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re International Application of KAJI, Akira et al.

International Serial No.: PCT/JP00/03639

International Filing date: June 5, 2000

For: CRYSTAL OF RIBOSOMAL RECYCLING FACTOR (RRF) PROTEIN
AND APPLICATION THEREOF ON THE BASIS OF THREE-
DIMENSIONAL STRUCTURAL DATA OBTAINED FROM THE CRYSTAL

VERIFICATION OF TRANSLATION

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington D.C. 20231

Sirs:

KUZUWA, Kiyoshi residing at AOI-Bldg., Honshio-cho 19,
Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, declares:

(1) that he knows well both the Japanese and
English languages;

(2) that he translated PCT International
Preliminary Examination Report (PCT/IPEA/409) in respect
of the above-identified International Application from
Japanese to English;

(3) that the attached English translation is a true
and correct translation of PCT International Preliminary
Examination Report (PCT/IPEA/409) in respect of the
above-identified International Application to the best of
his knowledge and belief; and

(4) that all statements made of his own knowledge
are true and that all statements made on information and
belief are believed to be true, and further that these
statements are made with the knowledge that willful false
statements and the like are punishable by fine or
imprisonment, or both, under 18 USC 1001, and that such
false statements may jeopardize the validity of the
application or any patent issuing thereon.

November 28, 2001

Date

K. Kuzawa

KUZUWA, Kiyoshi

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re International Application of KAJI, Akira et al.

International Serial No.: PCT/JP00/03639

International Filing date: June 5, 2000

For: CRYSTAL OF RIBOSOMAL RECYCLING FACTOR (RRF) PROTEIN
 AND APPLICATION THEREOF ON THE BASIS OF THREE-
 DIMENSIONAL STRUCTURAL DATA OBTAINED FROM THE CRYSTAL

VERIFICATION OF TRANSLATION

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
 Washington D.C. 20231

Sirs:

KUZUWA, Kiyoshi residing at AOI-Bldg., Honshio-cho 19,
 Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, declares:

(1) that he knows well both the Japanese and
 English languages;

(2) that he translated the above-identified
 International Application from Japanese to English;

(3) that the attached English translation is a true
 and correct translation of the above-identified
International Application to the best of his knowledge
 and belief; and

(4) that all statements made of his own knowledge
 are true and that all statements made on information and
 belief are believed to be true, and further that these
 statements are made with the knowledge that willful false
 statements and the like are punishable by fine or
 imprisonment, or both, under 18 USC 1001, and that such
 false statements may jeopardize the validity of the
 application or any patent issuing thereon.

November 28, 2001

Date

K. Kuzawa
 KUZUWA, Kiyoshi



17

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT-1741/KJ	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03639	International filing date (day/month/year) 05. 06. 00	Priority date (day/month/year) 04. 06. 99
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int.C1⁷ CO7K14/37, GOIN33/15, 33/50, 33/48		
Applicant KAJI, AKIRA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 27. 12. 00	Date of completion of this report 18. 05. 01
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/03639

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03639

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 51	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 51	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 51	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Cited document 1: NATURE, Vol. 399, No. 6734, (May, 1999), p. 323-329

Cited document 1 describes that the sequence of genome gene of *Thermotoga maritima* was determined and the gene represented by TM1399 encodes a ribosome recycling factor.

Here, it is perceived that at the time of the priority date of the present application, it was already a well known technique to one skilled in the art to perform analysis of crystal structure of a protein and determine its three dimensional structure and hence it would have been easy for one skilled in the art to think of determination of the three dimensional structure of a protein of which the primary structure was determined, which was disclosed in Cited document 1. In this case, it would have also been within routine work of one skilled in the art to replace an amino acid or acids at the active site to cause mutation as needed.

Also, it would have been within purview of one skilled in the art as needed to screen an inhibitor by use of the data of the three dimensional structure thus determined.

Therefore, it is perceived that it would have been easy for one skilled in the art to make the invention as defined in claims 1 to 51 on the basis of the teaching described in Cited document 1.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03639

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
JP, 2000-86696, A [E, X]	28.03.00	08.09.98	
JP, 2000-157275, A [E, X]	13.06.00	20.11.98	

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

VIII. Certain observations on the international application

Comments on clarity of claims, description and drawings or sufficient support of claims by the description will be shown as follows.

Since generally it is difficult to grasp a compound itself having desired properties by merely specifying the properties, the description that fails to disclose a clue to obtaining an active ingredient such as chemical structure would mean to require trials and errors beyond such an extent as expected to one skilled in the art in the process of obtaining the active ingredient necessary for practicing the present invention, i.e., in the processes of preparing countless compounds and screening them to confirm whether or not they have the properties concerned. Accordingly, it is judged not to have a disclosure on the invention clear and sufficient enough for one skilled in the art to be able to practice the invention.

Referring to the description of the present application, although the screening method for discriminating the compound and specific examples of the compound obtained by that method, including aminoglycosides, thiostreptone, viomycin, GMPPCP and fusidic acid, are disclosed, there is no disclosure on the clue such as chemical structure, for obtaining the active ingredient other than the above-specified compounds, and it is not perceived that it could have been guessed by one skilled in the art at the time of filing the present application. Therefore, one skilled in the art would not have been able to understand the active ingredient encompassed by claim 49 except for them and upon practicing the present invention, trials and errors beyond the extent expected to one skilled in the art in producing countless compounds and screening and confirming them are required.

The same is true of claim 51.

Therefore, the detailed description of the invention fails to disclose the invention as defined in claims 49 and 51 to such an extent that it is clear and sufficient enough for one skilled in the art to practice it based thereon.

37
Translation
09/980954

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

RECEIVED

APR 01 2002

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

TECH-CENTER 1600/2900

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT-1741/KJ	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03639	International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)	Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/37, G01N 33/15, 33/50, 33/48		
Applicant KAJI, Akira		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 27 December 2000 (27.12.00)	Date of completion of this report 18 May 2001 (18.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03639

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

☒ the international application as originally filed

☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03639

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-51	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-51	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-51	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Nature, May 1999, Vol. 399, No. 6734, pages 323-329

Claims 1-51

Document 1 describes that the arrangement of the genome genes of *Thermotoga maritima* has been decided and that a gene represented by TM1399 encodes a ribosomal recycling factor.

As of the priority date of the present application, it must have been a technique well-known to a person skilled in the art, to analyze the crystal structure of a protein for deciding its stereostructure. So, a person skilled in the art could have easily conceived of deciding the stereostructure of the protein decided in its primary structure described in document 1, and substituting the amino acid at an active site as required for mutation in this case is within the scope of usual practice by a person skilled in the art.

Furthermore, a person skilled in the art could have screened inhibitory substances as required using the information of the stereostructure decided like this.

So, a person skilled in the art could have easily arrived at the invention of claims 1-15 based on the description of document 1.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03639

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
JP,2000-86696,A [E,X]	28 March 2000 (28.03.2000)	08 September 1998 (08.09.1998)	
JP,2000-157275,A [E,X]	13 June 2000 (13.06.2000)	20 November 1998 (20.11.1998)	

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

In general, it is difficult to identify a compound having any desirable property, simply by specifying the desirable property. Therefore, a specification that does not describe any clue for obtaining an active ingredient such as a chemical structure requires trial and error in excess of the extent expected for a person skilled in the art for producing and screening innumerable compounds and confirming whether they have said property in the process of obtaining an active ingredient necessary for embodying the invention. So, it is judged that such a specification does not describe clearly or sufficiently to such an extent that a person skilled in the art can embody the invention.

In view of the above, the specification of the present application describes (1) the screening method for identifying compounds and (2) aminoglycosides, thiostrepton, viomycin, GMPPCP and fungic acid as particular examples of the compounds obtained according to the method, but does not describe a clue such as a chemical structure for obtaining the active ingredients other than the above specific compounds. It cannot be considered either that a person skilled in the art could have estimated them when the present application was filed. So, a person skilled in the art cannot understand the active ingredients included in claim 49 other than the specific compounds, and the specification requires trial and error in excess of the extent expected for a person skilled in the art for producing and screening innumerable compounds for confirmation.

This applies also to claim 51.

So, the "Detailed description of the invention" does not clearly or sufficiently describe the subject matters of claims 49 and 51 to such an extent as to allow a person skilled in the art to embody them.

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 01 JUN 2001

WIPO

PCT

5^T

出願人又は代理人 の書類記号 PCT-1741/KJ	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/03639	国際出願日 (日.月.年) 05.06.00	優先日 (日.月.年) 04.06.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C07K14/37, G01N33/15, 33/50, 33/48		
出願人 (氏名又は名称) 梶 昭		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.12.00	国際予備審査報告を作成した日 18.05.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	2936
	内田 俊生 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-51	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-51	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-51	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: NATURE, Vol. 399, NO. 6734, (May, 1999), p. 323-329

請求の範囲 1-51

引用文献1には、*Thermotoga maritima* のゲノム遺伝子の配列を決定したこと、TM1399で表される遺伝子がリボゾームリサイクリング因子をコードしていることが記載されている。

ここで、本願優先日当時、蛋白質の結晶構造解析を行い、立体構造を決定することは当業者において周知の技術であったものと認められるから、引用文献1に記載された1次構造の決定された蛋白質の立体構造を決定することは当業者が容易に想到し得たものと認められ、この際に必要に応じて活性部位のアミノ酸を置換して変異させることも当業者が通常行う範囲のことである。

また、このようにして決定された立体構造の情報を用いて阻害物質をスクリーニングすることは当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲1乃至51に係る発明は、引用文献1の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
JP, 2000-86696, A 「E, X」	28. 03. 00	08. 09. 98	
JP, 2000-157275, A 「E, X」	13. 06. 00	20. 11. 98	

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

一般に、所望の性質を特定することのみで、その性質を有する化合物自体を把握することは困難であるため、化学構造等の有効成分を得るための手がかりが記載されていない明細書は、発明の実施に必要な有効成分の入手過程において、無数の化合物製造、スクリーニングして、当該性質を有するか否かを確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものであり、当業者が発明の実施をすることができない程度に明確かつ十分に記載されていないものと判断される。

これを本願明細書についてみると、化合物を識別するためのスクリーニング方法と、該方法により得られた化合物の具体例としてアミノグリコシド類、チオストレプトン、バイオマイシン、GMP PCP 及びフンジン酸は記載されているものの、上記特定の化合物以外の有効成分を得るための化学構造等の手がかりが記載されておらず、かつ、それが出願時に当業者に推認できたものとも認められないので、それら以外の請求の範囲 49 に包含される有効成分を当業者が理解できず、発明の実施にあたり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものである。

請求の範囲 51 についても同様である。

したがって、発明の詳細な説明は、請求の範囲 49 及び 51 に係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年12月14日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/75182 A1

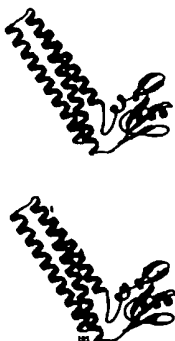
- (51) 国際特許分類: C07K 14/37, ダース (LILJAS, Anders) [SE/SE]; ルンド、S-221、ル
G01N 33/15, 33/50, 33/48 ンド大学生物物理学部、ボックス124 Lund (SE).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03639 (74) 代理人: 弁理士 葛和清司、外(KUZUWA, Kiyoshi et
al.); 〒160-0003 東京都新宿区本塩町19番地 AOIビル
(22) 国際出願日: 2000年6月5日 (05.06.2000) 葛和国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): JP, KR, US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) 優先権データ: 特願平11/158637 1999年6月4日 (04.06.1999) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 および (72) 発明者: 梶 昭 (KAJI, Akira) [JP/JP]; 〒203-0011 東京都東久留米市大門町1丁目1番9号 Tokyo (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): リルジャス アン のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CRYSTAL OF RIBOSOMAL RECYCLING FACTOR (RRF) PROTEIN AND APPLICATION THEREOF ON THE BASIS OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURAL DATA OBTAINED FROM THE CRYSTAL

(54) 発明の名称: リボソームリサイクリング因子 (RRF) タンパクの結晶及び該結晶から得られる三次元構造情報に基づく応用

(57) Abstract: A method for designing a compound capable of binding to the active site or the accessory binding site of RRF protein which comprises evaluating with a computer the chemical body of RRF protein on the basis of the structural coordinate obtained from RRF protein crystals; and a method for searching a compound capable of inhibiting the activity of RRF protein on the basis of the activity of inhibiting the binding of RRF protein to ribosome or an activity of inhibiting the behavior of RRF protein on ribosome. These methods are useful in clarifying the three-dimensional structure and function mechanism of RRF, thereby contributing to the development of various bactericides, fungicides, herbicides, etc.

WO 00/75182 A1





(57) 要約:

本発明は、RRFタンパクの活性部位又は補助的結合部位と結合し得る化合物を設計する方法であって、RRFタンパク結晶から得られる構造座標に基づき、その化学的実体をコンピューター評価してなる、前記方法、及びRRFタンパクのリボソームへの結合を阻害する活性又はRRFタンパクのリボソーム上における挙動を阻害する活性に基づいて、RRFタンパクの活性を阻害し得る化合物を探索する方法に関するものであり、RRFの3次元構造及び作用機作を解明し、種々の抗菌剤、抗カビ剤及び除草剤等の開発に寄与する。

明 細 書

リボソームリサイクリング因子 (RRF) タンパクの結晶
及び該結晶から得られる三次元構造情報に基づく応用

[技術分野]

本発明は、リボソームリサイクリング因子 (Ribosome recycling factor, 以下RRF) の結晶に関する。また本発明は、該結晶のX線回折により得られるRRFタンパクの立体構造に関する。さらに本発明は、RRFタンパクの構造情報及び作用機作を応用した、RRF変異体、ホモログ等の構造決定、そして次世代抗菌剤、抗カビ剤、除草剤を開発する技術に関する。

[背景技術]

蛋白質生合成は、すべての細胞の生命活動において必要不可欠な機能であり、「開始」、「伸展」、「終結」及び「リボソームリサイクリング」の四段階から成り立っている。蛋白質生合成における最終的なステップ（第4ステップ）は、次の「開始」段階へリボソームを再利用する為に、メッセンジャーRNA、転移RNA、リボソームからなる終結複合体を各々遊離、解離させることにより終了する。原核生物である大腸菌においては、このリボソームの「再利用」はリボソームリサイクリング因子 (Ribosome recycling factor, 以下RRF) とエロンゲーション因子G (elongation factor G, 以下EFG) 又は解離因子3 (Release factor3) により触媒されることが分かっている。このリボソーム「再利用」の過程はJanosi博士らによる総説 (1996 Adv. Biophys. 32:121-201) 及び梶らの総説 (Biochem, Biophys, Res Commun. 250 1-4、蛋白質 核酸 酵素、44巻7号 83-84 (1999)) において紹介されている。

真核生物において蛋白質翻訳終結複合体の解離はRRFではない他の因子により触媒される可能性が示唆されており、真核生物のmRNAはモノシストロニックで原核生物のそれはポリシストロニックである (Kozak 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3438-3445; Dasら 1984, Nucleic Acids Res. 12:4757-4768; Schonherら 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:8506-8510; Sprengelら 1985 Nucleic Acids Res. 13:893-909) ことから、真核生物においてリボ

ソームのmRNAよりの解離が阻害されても下流のシストロンに影響することはない。このように真核生物における蛋白質生合成の最終段階にあたる蛋白質翻訳終結複合体の解離という第4段階が原核生物のものと異なると考えられるので、特に新しい型の抗生物質のターゲットとして期待されている。

一方、現在では数多くの抗菌剤が開発されており、この中には非常に高い殺菌作用を示すものも存在している。しかし、このようにして得られた抗菌剤には、その作用部位が不明なままのものが数多く存在する。これまでは、これらの活性を示す抗菌剤をランダムスクリーニングの材料として用い、構造活性関係を樹立しつつさらなる効用のあるものを開発していく方法が中心であったが、これには莫大な時間と労力を要する。

そこで近年、この問題を排除し能率良く阻害剤の発見が行われることを目的としてデータベース化が図られている。それを基本にしてラショナルドラッグデザイン法が検討され開発されつつある。この例として、最近上市された抗HIV剤であるプロテアーゼの阻害剤が挙げられる。HIVのプロテアーゼは結晶化され、その立体構造が知られている。この構造と活性部位の三次元構造アミノ酸配列を基にしてコンピューターより既知の化合物からこの部位に最も親和性の高いものを選び、その阻害活性が測定されている。活性の出たものと標的蛋白の共結晶を作り、三次元構造の測定を行うことによりさらによりよく結合する化合物を予測できるので、これを合成しその阻害活性が測定されている。そして再びこの物質と標的蛋白との共結晶を作り、上記の過程を繰り返すことにより極めて有効な物質を得ることができる。

ところで、上記のような従来の抗生物質への耐性獲得菌株が数多く報告されてきており、細菌の発育を直接的に制限し得る部位を標的とする、新たな抗生物質の開発が早急に必要とされている。そこで本発明者らは前記RRFが抗菌剤の新たなターゲットとなり得ることに着目し鋭意研究を進めてきたが、この着想が近年脚光を浴びつつある。

[発明の開示]

RRFに関して、本発明者らはこれまでに大腸菌を始め、原核生物のみに留まらず真核生物に関するものまで数種の遺伝子配列を決定した(特開平3-20079

7、PCT/JP98/00734、特願平10-150493)。従って、そこから得られるアミノ酸配列によりその二次構造までが推定可能ではある。しかしながら、現在の技術水準においては、この二次構造から実際の立体構造を同定するまでには至っていない。実際のタンパクにおいては各アミノ酸残基が相互的に作用しており、また場合によってはさまざまな修飾を受けてその立体構造を形成している。従ってタンパクの立体構造が分れば、そのリガンドとなりうる物質を創製することが可能であり、この意味で有用な抗生物質を創製するためには、結晶化による三次元構造の決定がきわめて重大な意義を有することとなる。

従って本発明の課題は、RRFの立体構造を解明し、種々の抗菌剤、抗カビ剤及び除草剤の開発に寄与することにある。

[図面の簡単な説明]

[図1]は、XRRFタンパク結晶を示す写真図である。

[図2]は、XRRFタンパク結晶のX線回折像を示す写真図である。

回折像の詳細 : xfl to 1200 of 1200, yf 1 to 1200 of 1200

回折像の方向 : xf to the right, yf up

データのファイル順 : -xf + yf

最大ピクセル値: 65535

スケールの限界: 最小=1、最大=1200、黒は回折強度の高い値を示す。

[図3]は、RRFのリボンによる描画の写真図である。図に示されるように2ドメインからなり、1つは3つのヘリックスからなり、2つめのドメインは、 β -シート、コイルヘリックスの複合体である。

[図4]は、RRFの空間充填モデルの写真図である。

[図5]は、RRFの作用機作についての仮説を示す模式説明図である。

[図6]は、各種阻害剤により、終結複合体からの転移RNAの遊離が阻害されることを示すグラフである。エラーバーは標準偏差を示す。

[図7]は、各種濃度の転移RNAの存在下におけるリボソームの遊離阻害を示すLineweaver-Burkプロットによるグラフである。

[図8]は、パロモイシシンの存在下において、リボソームへのRRFの

結合が阻害されることを示すグラフである。エラーバーは標準偏差を示す。

[符号の説明]

1…リボソーム、2…転移RNA、3…メッセンジャーRNA、4…RRF、5…EFG、6…終結複合体。

本発明者らは上記の現状を踏まえ、RRFに関し研究を進める中で、RRFの結晶を得てその立体構造を同定することに初めて成功し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

即ち本発明は、RRFタンパクの結晶及びその製法と立体構造に関する。

より具体的には、RRFタンパクの活性部位又は補助的結合部位と結合し得る化合物を設計する方法であって、RRFタンパク結晶から得られる構造座標に基づき、その化学的実体をコンピューター評価してなる、前記方法に関する。

また本発明は、RRFタンパク結晶が、RRFタンパク自体の結晶、RRFタンパク変異体の結晶、RRFタンパクホモログの結晶及びRRFタンパクの共複合体の結晶のいずれかである、前記方法に関する。

本発明はまた、RRFタンパク結晶が、bipyramid系である、前記方法に関する。

さらに本発明は、RRFタンパク結晶が、空間群 $P4_12_12_1$ 又は空間群 $P4_32_12$ を有する、前記方法に関する。

また本発明は、RRFタンパク結晶が、 $0.3 \times 0.3 \times 0.5 \text{ nm}$ の大きさを有する、前記方法に関する。

本発明はまた、RRFタンパク結晶が、 $a=b=47.3 \text{ \AA}$ 、 $c=297.6 \text{ \AA}$ の大きさの各単位格子を有する、前記方法に関する。

さらに本発明は、RRFタンパク結晶が、表7による構造座標により特徴づけられる、前記方法に関する。

また本発明は、RRFタンパク結晶が、*Thermotoga Maritima*由来のものである、前記方法に関する。

本発明はまたRRFタンパク結晶が、斜方晶系である、前記方法に関する。

さらに本発明は、RRFタンパク結晶が、空間群 $P2_12_12$ を有する、前記方法に関する。

また本発明は、RRFタンパク結晶が、 $30 \times 50 \times 250 \mu\text{m}$ の大きさを有する、前記方法に関する。

本発明はまた、RRFタンパク結晶が、菌X由来のものである、前記方法に関する。

さらに本発明は、RRFタンパク結晶が、滴状蒸気拡散法により結晶化されている、前記方法に関する。

また本発明は、RRFタンパク結晶が重原子誘導体であって、該結晶がRRFタンパク自体の結晶、RRFタンパク変異体の結晶、RRFタンパクホモログの結晶及びRRFタンパクの共複合体の結晶のいずれかである、前記方法に関する。

本発明はまた、重原子誘導体が、チロメサール、チオリンゴ酸金、酢酸ウラニル及び塩化鉛からなる群より選択される化合物との反応により形成されている、前記方法に関する。

さらに本発明は、RRFタンパク結晶が、白金又は水銀による重原子誘導体である、前記方法に関する。

本発明はまた、RRFタンパクがモノマーである、前記方法に関する。

また本発明は、RRFタンパクが、表5又は表6によるアミノ酸変位により特徴づけられる、前記方法に関する。

さらに本発明は、活性部位又は補助的結合部位に結合する化学的実体により特徴づけられる化合物が、RRFタンパクの阻害物質であることを特徴とする、前記方法に関する。

また本発明は、前記阻害物質がRRFの競合的、非競合的又は不競合的阻害物質であることを特徴とする、前記方法に関する。

本発明はまた、RRFタンパクの活性部位又は補助的結合部位におけるリガンドの配向を決定することを含む、前記方法に関する。

さらに本発明は、構造座標が表7による、RRFタンパクの構造座標であることを特徴とする、前記方法に関する。

また本発明は、RRFタンパクのポケットが、RRFタンパクの二つのドメインを隔てる折れ曲がり部分に位置するC末端近傍のポケットである前記方法に関する。

さらに、本発明は、上記化合物が、RRFタンパクのリボソームへの結合を阻害し、又はRRFタンパクのリボソーム上での挙動を阻害する前記方法に関する。

本発明はまた、前記方法により得られる、RRFタンパクの阻害物質に関する。

また、本発明は、RRFタンパクのリボソームへの結合を阻害する活性又はRRFタンパクのリボソーム上での挙動を阻害する活性に基づいて、RRFタンパクの活性を阻害し得る化合物を探索する方法に関する。

さらに、本発明は、上記の方法により得られる、RRFタンパクの阻害物質に関する。

また本発明は、RRFタンパクの変異体、ホモログ又は共複合体の結晶形態を分子置換により解明することを含む、RRFタンパクの3次元構造を決定する方法に関する。

本発明はまた、斜方晶系のRRFタンパク結晶に関する。

また本発明は、空間群 $P2_12_12$ を有する、前記RRFタンパク結晶に関する。

さらに本発明は、 $30 \times 50 \times 250 \mu m$ の大きさを有する、前記RRFタンパク結晶に関する。

本発明はまた、RRFが菌X由来のものである、前記RRFタンパク結晶に関する。

また本発明は、bipyramid系である、RRFタンパク結晶に関する。

さらに本発明は、空間群 $P4_12_12$ 又は空間群 $P4_32_12$ を有する、前記RRFタンパク結晶に関する。

本発明はまた、 $0.3 \times 0.3 \times 0.5 mm$ の大きさを有する、前記RRFタンパク結晶に関する。

また本発明は、 $a=b=47.3 \text{ \AA}$ 、 $c=297.6 \text{ \AA}$ の大きさの各単位格子を有する、前記RRFタンパク結晶に関する。

本発明はまた、表5又は表6によるアミノ酸変位により特徴づけられる、前記RRFタンパク結晶に関する。

さらに本発明は、表7による構造座標により特徴づけられる、前記RRFタン

パク結晶に関する。

また本発明は、Thermotoga Maritima由来のものである、前記RRFタンパク結晶に関する。

本発明はまた、滴状蒸気拡散法により結晶化された、前記RRFタンパク結晶に関する。

さらに本発明は、結晶がRRFタンパク自体の結晶、RRFタンパク変異体の結晶、RRFタンパクホモログの結晶及びRRFタンパクの共複合体の結晶のいずれかである、前記RRFタンパク結晶に関する。

また本発明は、活性部位のアミノ酸が、配列番号1のArg 110、Arg 129及びArg 132からなる群から選択される、RRFタンパクに関する。

本発明はまた、活性部位又は補助的活性部位中の1つ以上のアミノ酸が、天然に存在するアミノ酸、非天然アミノ酸、セレノシステイン及びセレノメチオニンからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸により置換されている、前記RRFタンパクに関する。

さらに本発明は、活性部位又は補助的活性部位中の親水性アミノ酸及び疎水性アミノ酸が置換されている、前記RRFタンパクに関する。

また本発明は、少なくとも1つのシステインアミノ酸が、セレノシステイン又はセレノメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸により置換されている、前記RRFタンパクに関する。

本発明はまた、少なくとも1つのメチオニンアミノ酸が、セレノシステイン又はセレノメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸により置換されている、前記RRFタンパクに関する。

さらに本発明は、結晶形態である、前記RRFタンパクに関する。

本発明はまた、野生型酵素より高いか、又は低い比活性を有する、前記RRFタンパクに関する。

また本発明は、変化した基質特異性を有する、前記RRFタンパクに関する。

さらに本発明は、化合物とRRFタンパクとの結合相互作用を測定するための、前記RRFタンパクの使用に関する。

さらに本発明は、RRFタンパクの表面上、表面又はその近傍の少なくとも1

個のアミノ酸残基が置換されており、表面荷電の1以上の荷電単位の変化が生じている、前記RRFタンパクに関する。

RRFが理想的な抗菌剤の標的であることが推定される現在、本発明により解明されたRRFの三次元構造は、抗菌剤などの開発に直結しているので、産業上極めて重要である。しかも多くの病原菌のRRFの一次構造が酷似していることが知られていることから(例えば緑膿菌のRRFは大腸菌のそれと60%の相同性を有する)、本発明によるRRFの三次元構造のデータにより、他の病原菌のRRFの三次元構造についてもその解明が極めて容易になる。従って、種特異性の抗菌剤を開発するためにも、本発明は、RRF阻害による次世代抗生物質、抗カビ剤及び除菌剤開発に、特にラショナルドラッグデザインにより抗菌剤を開発する際の一つの指標として極めて有用である。

本明細書中で使用される用語を以下のように定義する；

「RRFタンパク」とは、通常の状態では酵素活性を有するRRFタンパク質を意味する。

「天然に存在するアミノ酸」とは、天然に存在するアミノ酸のL-異性体を意味する。天然に存在するアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン及びリジンである。特に断りがない限り、本明細書中のアミノ酸はL体である。

「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で天然には見出されないアミノ酸を意味する。本明細書で使用される非天然アミノ酸の例として、セレノシステイン及びセレノメチオニンのラセミ混合物が挙げられる。さらに非天然アミノ酸として、ノル-ロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD又はL体及びD-フェニルアラニンが挙げられる。

「正に荷電したアミノ酸」とは、正常な生理学的条件下で正に帯電した側鎖を有する任意の天然に存在するアミノ酸又は非天然アミノ酸を包含する。

正に荷電した天然アミノ酸の例としては、アルギニン、リジン及びヒスチジンが挙げられる。

「負に荷電したアミノ酸」とは、正常な生理学的条件下で負に帯電した側鎖を有する任意の天然に存在するアミノ酸又は非天然アミノ酸を包含する。負に荷電した天然アミノ酸の例としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。

「疎水性アミノ酸」とは、比較的水に不溶性である非荷電の非極性側鎖を有する任意のアミノ酸を意味する。天然に存在する疎水性アミノ酸の例は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンである。

「親水性アミノ酸」とは、比較的水に可溶性である非荷電の極性側鎖を有する任意のアミノ酸を意味する。天然に存在する親水性アミノ酸の例は、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン、グルタミン及びシステインである。

「変異体」とは、野生型E. ColiのRRF配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換により特徴づけられるRRFポリペプチド(即ち、野生型RRFの生物学的活性を示すポリペプチド)をいう。このような変異体は、例えばオリゴヌクレオチド特異的誘発によりそのコード配列中で変異したRRFのcDNAの発現により得ることができる。またRRF変異体は、非天然アミノ酸のRRFタンパクへの部位特異的取り込みにより、Noren, C. J. 等(Science, 224, p182-188 (1989))による一般的な生合成方法により得ることができる。

セレノシステイン又はセレノメチオニンは、栄養要求性E. Coli株におけるRRFをコードするcDNAの発現により、野生型又は変異型RRF中に取り込まれる。この方法において、野生型又は変異型RRF cDNAは、天然システイン又は天然メチオニンのいずれか(又は両方)を含有せず、セレノシステイン又はセレノメチオニン(又は両方)が富化されている増殖培地上の宿主中で発現させることができる。さらにセレノメチオニンは、野生型又は変異型RRF中にメチオニン代謝阻害法(Van Dyne G. D. 等によるJ. M. B, 229 pp105(1993))により取り込むことができる。

「表面荷電の変化」とは、野生型RRFと比較した生理学的pHでの変異体ポリペプチドの1つ以上の荷電単位の変化を意味する。これは、好ましくは少なくとも1つ以上の野生型RRFのアミノ酸における生理学的pHでの野生型側鎖と異なる荷電を有する側鎖を含むアミノ酸への変異により得ることができる。表面荷電の変化は、置換されたアミノ酸を有するポリペプチドの等電点を測定し、これを野生型RRF分子の等電点と比較することにより決定される。

「基質特異性の変化」とは、野生型RRFと比較した変異型RRFの基質の変化をいう。基質特異性(種特異性)は、リボゾーム、tRNA、EF-Gを病原菌から分離し、それらがE. ColiのRRF及びRRF変異種の基質となり得るかにより決定する。

「キネティック形態」とは、遊離形態又は非結合形態の酵素の状態あるいはその活性部位又は補助的活性部位のいずれかで化学的実体と結合した酵素の状態をいう。

「競合」インヒビターは、RRFの基質が結合するのと同じRRFのキネティック形態に結合すること、従ってRRFの活性部位と直接競合することにより、RRF活性を阻害するインヒビターである。

「不競合」インヒビターは、基質が結合するのと異なるRRFのキネティック形態に結合することによりRRFを阻害するインヒビターである。

「非競合」インヒビターは、RRFの遊離形態又は基質結合形態のいずれかに結合するインヒビターである。

「ホモログ」とは、RRF又はRRFの任意の機能ドメインと少なくとも30%のアミノ酸配列の相同性を有するタンパク質を意味する。

「共複合体」とは、化学的実体又は化合物と共有結合又は非共有結合したRRF又はRRFの変異体又はホモログを意味する。

「 β -シート」とは、拡大ジグザグコンホメーションにのびるポリペプチド鎖のコンホメーションをいう。平行にのびるポリペプチドポリペプチド鎖部分は全て同じ方向にのびる。逆平行にのびるポリペプチド鎖は、平行線とは反対方向にのびる。

「活性部位」又は「活性部位部分」とは、RRF内の以下の任意の部位又は全

ての部位をいう。基質結合部位は、リボソーム及びその複合体が結合する部位及び基質の分解がおこる部位であり、活性部位は、配列番号1を用いて、少なくともアミノ酸残基110、129、132の近辺である。

「構造座標」とは、結晶形態におけるRRF分子の原子(分散中心)によるX線単色ビームの回折で得られるパターンに関する数式から得られる数学的座標をいう。分散データは、結晶の反復単位の電子密度地図を計算するために使用され、電子密度地図は、結晶の単位格子内のそれぞれの原子の位置を確立するために使用される。

「重原子誘導体」とは、RRFタンパク結晶の化学的に修飾された形態をいう。その作製には実際には、結晶を通して拡散することができ、そしてタンパク質の表面に結合することができる重金属原子塩又は有機金属化合物(例えば塩化鉛、チオマレイン酸金、チロメサル又は酢酸ウラニル)を含有する溶液中に浸される。結合した重金属原子(単数又は複数)の位置(単数又は複数)は、浸漬した結晶のX線回折分析により決定することができる。次にこの情報を用いて、酵素の3次元構造を構築するために使用される位相情報が作成される。X線結晶学により決定された構造座標のセットは、標準誤差を有することが当業者に理解されよう。本発明の目的のために、表7に列挙した構造座標に重ね合わせた場合に、0.75 Å未満のタンパク質骨格原子(N、C α 、C及びO)の二乗平均平方根偏差を有するRRF又はRRFホモログ又はRRF変異体の構造座標の任意のセットは同一であると考えられるべきである。

「単位格子」とは、基本的な平行6面体形のブロックをいう。結晶の全容積は、このようなブロックの規則的な積み重ねの反復により構築することができる。

「空間群」とは、結晶の対象要素の配置をいう。

「分子置換」とは、観察された未知結晶の回折パターンを説明するのに最適なように、未知結晶の単位格子内で、その構造座標(例えば表7の構造座標)が他の公知である分子を方向付けし、位置付けすることにより、構造座標が知られていないRRF結晶の仮のモデルを作成する工程を含む方法をいう。次いで、位相がこのモデルより算定され、そして観察された振幅と合成して、

その座標が知られていない構造の近似フーリエ合成を得る。次いで精製物質に適用して、最終的に正確な未知結晶の構造を得ることができる。本発明によるRRFの構造座標を用いて、分子置換を使用することによりRRFの変異体、ホモログ、共複合体又は異なる結晶構造の構造座標を決定することができる。

本発明の実施例においては、X菌由来RRF及び*Thermotoga Maritima*由来RRFを用いて結晶化し、構造解析を行ったが、その他のRRFについても同様に実施することができる。また結晶化に際してはRRFタンパク自体のみならず、RRFタンパク変異体、RRFタンパクホモログ、RRFタンパク共複合体を結晶化し、それぞれ構造解析することも可能である。

「ポケット」とは、RRFタンパク表面に存在する窪みをいい、RRFタンパクの結合部位若しくは補助的結合部位に存在する結合ポケットの他、RRFの活性の発現に際し、基質等との結合に関与しない他のポケットをも包含する。

本発明は、X菌のRRF及び*Thermotoga Maritima* RRFの結晶及びそれから決定されるRRFの構造を初めて提供する。一方*Thermotoga Maritima* RRFの結晶は硫酸溶液から形成された。結晶はbipyramid型の空間群 $P4_32_12$ を有する。この結晶の単位格子は $a=b=47.3\text{ \AA}$ 、 $c=297.6\text{ \AA}$ を有する。RRFの構造座標を表7に示す。結晶パッキングは、RRFがモノマーであることを示している。

図3は、*Thermotoga Maritima* RRFのリボンによる描画を示す。ヘリックスA、B、C、D、E、FはN末端よりC末端に向けて存在するヘリックスを示す。 β -シート1、2、3、4、5、6はN末端からC末端にかけて存在する β -シートの番号である。図に示されるようにRRFは、2ドメインからなり、1つは3つのヘリックスからなり、2つめのドメインは β -シートコイル、ヘリックスの複合体である。そして活性部位は図のE、Fヘリックスにまたがり、又活性の維持にヘリックスB、C、D、 β -シート1、2、3、4、5を含むドメインの3次元構造の保持が重要である。

図4は、*Thermotoga Maritima* RRFの空間充填モデルを表し、N及びCはそれ

ぞれN末端、C末端を示す。灰色は炭素、赤は酸素、紫はN原子を表し、数字はアミノ酸配列の番号を示し、1はN末端である。

このように本発明者らにより解明されたRRFの3次元構造に関する情報に基づき、酵素の活性部位及び補助的結合部位の同定が初めて可能になった。そして活性部位部分は、後述するRRF遺伝変異の結果と併せて、少なくとも配列番号1のアミノ酸残基Arg 110, Arg 129, Arg 132を含む可能性が大きいことがわかった。

本発明は、化学的実体及び化合物を設計、選択及び合成する分子設計技術の使用をRRFに関して初めて可能にする。化学的実体及び化合物には、RRFの活性部位又は補助的結合部位の全て又は一部分に結合することができる阻害性化合物を含む。本発明により可能なアプローチの際に、酵素に結合する化合物を設計し、そして種々の方法において、化合物の物理的特性(例えば可溶性)を改変するためにRRFの構造座標が使用される。例えば本発明は、RRFの活性部位の全て又は一部分に結合することにより、RRFの競合阻害剤として作用する化合物の設計を可能にする。本発明はまた、RRFの不競合阻害剤として作用する化合物の設計を可能にする。これらの阻害剤は、基質にすでに結合したRRFの補助的結合部位の全て又は一部分に結合することができ、そしてRRF活性部位に対してのみ結合する競合阻害剤よりも強力であり、かつより非特異的であることができる。同様にRRFに結合して阻害する非競合阻害剤は、別の化学的実体に結合していてもいなくても、本発明により得られた構造座標を用いて設計することができる。

第二の設計アプローチは、RRF阻害剤候補とRRFとの間の相互作用のための最適部位を決定するために、RRF結晶を種々の化学的実体からなる分子で確認することである。例えば溶媒で飽和された結晶から回収された高分解能のX線回折データは、各型の溶媒分子の位置の決定を可能にする。次いで、これらの部位に強く結合する小さな分子を設計、合成することができ、そして阻害剤活性について試験することができる(Travis, J., Science, 262, p1374 (1993))。

本発明はまた基質又はRRFに結合する他の化合物のRRFとの反応において、R

RFインヒビターの改良アナログの設計又はRRF及びRRFインヒビター共複合体の反応中間体に基づく新規なクラスのインヒビターの設計に有用である。これは、高い特異性及び高い安定性の両方を有するRRFインヒビターを設計するための新規な手段を提供する。

本発明により可能となり、容易となる別のアプローチとしては、RRFに全体的に又は部分的に結合し得る化学的実体又は化合物について、コンピュータでスクリーニングすることである。このスクリーニングにおいて、結合部位に対するこのような実体又は化合物の適合の特性は、形状相補性又は見積もられた相互作用エネルギーのいずれかによって判断され得る (Meng, E. C. et al J. Comp. Chem, 13, 505-524 (1992))。

RRFが1つより多くの結晶形態で結晶化することができる場合、本発明により提供されるようなRRFの構造座標又はその一部は、RRFの他の結晶形態の構造を解析するために特に重要である。RRFの構造座標又はその一部は、RRF変異体の構造、RRF共複合体の構造、又はRRFの任意の機能ドメインに有意に相同なアミノ酸配列を有する任意の他のタンパク質の結晶形態の構造を解析するために使用することもできる。

この目的に使用することができる方法の1つに、分子置換がある。この方法では、未知の結晶構造がRRFの別の形態、RRF変異体又はRRF共複合体又はRRFの任意の機能ドメインに有意に相同なアミノ酸配列を有する任意の他のタンパク質の結晶形態であるかどうかを表7に提供するような本発明のRRFの構造座標を用いて決定することができる。この方法は、未知の結晶についての正確な構造形態をこのような情報を最初から決定しようとするよりも、より迅速かつ効率よく提供する。

さらに本発明によると、RRF変異体は、公知のRRF阻害剤との共複合体で結晶化することができる。次いでこのような複合体の一連の結晶構造は、分子置換によって解析することができ、そして野生型RRFの結晶構造と比較することができる。従って、酵素の種々の結合部位内の改変するのに有力な部位を同定することができる。この情報により、RRFと化学的実体又は化合物との間の最も有効な結合相互作用 (例えば増加した疎水性相互作用) を決定する手段

を提供する。

上記の全ての複合体は、公知のX線回折技術を用いて研究することができ、そしてコンピューターソフトウェア(例えばX-POLAR、Yale University, 1992, Molecular Simulation, Incにより配布)を用いて2~3Å分解能X線データを対照に約0.20以下のR値に精密化することができる(例えばBlundel & Johnson, Protein Crystallography, Academic Press (1976)、Methods in Enzymology, Vol114,115、H. W. Wycoff et al, Academic Press (1985)。従ってこの情報は、RRF阻害剤を最適化するために使用することができ、さらに重要なことに、新規なRRF阻害剤を設計し、そして合成するために使用することができる。本発明で提供されるRRFの構造座標は又、機能、構造、あるいはその両方においてRRFに類似の関連タンパク質、酵素又は核酸の同定を容易にする。これにより、RRF自体及び上記類似タンパク質等の活性部位、結合部位等をよりの確に推定でき、新たな抗菌剤、除草剤又は抗カビ剤につながる。

本発明のRRFに結合又は阻害する化合物の設計には、一般に、2つの要素を考慮する必要がある。第一に、化合物は物理的に、構造的にRRFに結合することができなくてはならない。RRFのその基質との結合に重要な非共有結合分子間相互作用には、水素結合、ファンデルワールス力及び疎水性相互作用が挙げられる。

第二に、化合物はRRFとの結合を可能にするコンホメーションを想定することができなくてはならない。化合物の特定の部分は、このRRFとの結合に直接的には関与しないが、それらの部分はそれでも分子のコンホメーション全体にわたって影響し得る。このことはまた有効性に顕著な影響を及ぼす。このようなコンホメーションの必要条件としては、全ての又は一部の結合部位(例えばRRFの活性部位又は補助的結合部位)に関する化学的実体あるいは化合物の三次元構造及び配向全体、又はRRFと直接相互作用するいくつかの化学的実体を含む化合物の官能基間の間隔が挙げられる。

RRFに対する化学化合物の潜在的阻害効果又は結合効果は、それが実際に合成される前に分析することができ、そしてコンピュータモデリング技術を使

用して、試験することができる。所定の化合物の理論的構造が、その化合物とRRFとの間に不十分な相互作用及び結合があることを示唆する場合、その化合物の合成及び試験は回避できる。しかし、コンピュータモデリングが強い相互作用を示唆する場合には、その分子を合成し、そして平島と梶の方法(Biochemistry, 11, 4037, (1972))又はオリゴヌクレオチドを用いる方法及びインビボでのスクリーニング(特願平10-158643)により阻害する能力について試験することができる。この方法により効果のない化合物の合成を回避することができる。

RRFの阻害性化合物又はRRFの他の結合化合物は、コンピュータで評価することができ、そして化学的実体又はフラグメントが、RRFの個々の結合ポケット又は他の領域と結合するそれらの能力についてスクリーニング及び選択される一連の工程の手段により設計することができる。

化学的実体又はフラグメントをRRF、より詳細にはRRFの結合部位若しくは補助的結合部位の個々の結合ポケット又は、RRFの活性の発現に際し、基質等との結合に関与しない他のポケットと結合するそれらの能力についてスクリーニングするいくつかの方法の1つを使用することができる。このプロセスは、例えば表7のRRF座標に基づくコンピュータスクリーニングの際に、活性部位の視覚的検討により開始することができる。例えば、図3のリボンによる描画に示すように「L」字型の形状を有するRRFは、二つのドメインを隔てる「L」字の折れ曲がり部分に位置するC末端近傍にポケットを有するが、このポケットに結合する化合物はRRFの阻害性化合物の有力な候補となり得る。上記のポケットは、表7に示すRRF座標に基づいてRasmol等のソフトウェアを使用して空間充填モデルを作成すれば容易に観察することができる。このポケットは、RRFの二つのドメインの間に位置することから、上記ドメインの間の角度の調節を介してRRFの活性に関与する可能性が示唆される。次いで選択されたフラグメント又は化学的実体は、種々の配向で位置づけられることができ、又はRRFの個々の結合ポケットに連結することができる。連結はQuanta及びSybylのようなソフトウェアを使用して達成することができ、その後標準的な分子機構力場(例えばCHARMM, AMBER)を用いて、エ

エネルギーの最小化及び分子動力学を行う。

専門化されたコンピュータプログラムは、フラグメント又は化学的実体を選択するプロセスを補助することができる。これらのプログラムの例には以下が挙げられる：

GRID(Goodford, P. J., "A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules", J. Med. Chem., 28, pp. 849-857 (1985))、これはOxford University, oxford, UKより利用可能である。MCSS(Miranker, A及びM. Karplus, "Functionality Map of Binding Sites: A Multiple Copy Simultaneous Search Method.", Proteins: Structure, Function and Genetics, 11, pp. 29-34 (1991))、これはMolecular Simulations, Burlington, MAから入手可能である。AUTODOCK(Goodsell, D. S. 及びA. J. Olsen, "Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing", Proteins: Structure, Function and Genetics, 8, pp. 195-202 (1990))、これはScripps Research Institute, La Jolla, CAから入手可能である。DOCK(Kuntz, I. D. et al, "A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions", J. Mol. Biol., 161, pp. 269-288 (1982))、これはUniversity of California, San Francisco, CAから利用可能である。

一度、適切な化学的実体又はフラグメントが選択されると、化学的実体又はフラグメントは、単一の化合物又は阻害剤に組み立てることができる。組み立てはRRFの構造座標に関してコンピュータースクリーン上に示される三次元画像でのフラグメントの相互関係の視覚的検討により行うことができる。次いでQuanta又はSybylのようなソフトウェアを用いて、マニュアルによるモデル構築を行う。

個々の化学的実体又はフラグメントを接触させる場合に、当業者を補助することができる有用なプログラムの例には以下が挙げられる：

CAVEAT(Bartlett, P. A. et al, "CAVEAT: A Program to Facilitate the Structure-Derived Design of Biologically Active Molecules", Mole

cular Recognition in Chemical and Biological Problems", Royal Chem. Soc., 78, pp. 182-196 (1989)), これはthe University of California, Berkeley, CAから入手可能である。MACCS-3D(MDL Information Systems, San Diego, CAのような3D Database systems、この領域は、Martin, Y. C., "3D Database Searching in Drug Design", J. Med. Chem., 35, pp. 2145-2154 (1992)に概説される。HOOK(Molecular Simulations, Burlington, MAから入手可能である)。

上記のように一度に1つのフラグメント又化学的実体から段階様式でRRF阻害剤を構築するかわりに阻害化合物又は他のRRF結合化合物は、RRFからの活性部位(又は必要に応じて公知の阻害剤のいくつかの部分を含む)を用いて全体的に、又は新しく設計することができる。これらの方法には以下が挙げられる:

LUDI(Bohm, H. J., "The Computer Program LUDI: A New Method for the de novo Design of Enzyme Inhibitors", J. Comp. Aid. Molec. Design, 6 pp. 61-78 (1992)、これはBiosym Technologies, San Diego, CAより入手可能である。LEGEND(Nishibata, Y. 及びA. Itai, Tetrahedron, 47, p. 8985 (1991)、これはMolecular Simulations, Burlington, MAより入手可能である。LeapFrog(Tripos Associates, St. Louis, MOから利用可能である)。

他の分子モデリングを本発明において使用することができる。例えばCohen, N. C. 等によるMolecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry, J. Med. Chem., 33, p883-894 (1990)を参照されたい。又Navia, M. A. 及びM. A. Murcko, The Use of Structural Information in Drug Design, Current Opinions in Structural Biology, 2, p. 202-210 (1992)も参照されたい。

一度、化合物が上記の方法により、設計又は選択されると化合物がRRFに結合することが可能な有効性は、コンピュータ評価により試験することができ、そして最適化することができる。例えばRRF阻害剤として機能するように設計又は選択された化合物は、天然の基質に結合する場合に、活性部位により

占有される容量に重複しない容量を、好ましくは検討すべきである。有効なRRF阻害剤は、好ましくはその結合状態と遊離状態との間のエネルギー(即ち、小さな結合のひずみ力において、比較的小さな相違を示すべきである。従って最も有効なRRF阻害剤は、約10kcal/molを超えない、好ましくは約7kcal/molを超えない結合のひずみ力を伴って設計されるべきである。RRF阻害剤は、全体にわたる結合エネルギーが類似の1より多いコンホメーションで、酵素と相互作用し得る。それらの場合、結合のひずみ力は、遊離化合物のエネルギーと阻害剤が酵素に結合する場合に観察されるコンホメーションの平均エネルギーとの間の相違になる。

RRFに結合するように設計又は選択された化合物は、その結合状態において、好ましくは標的酵素との反発する静電相互作用を有さないようにコンピュータにより最適化される。このような非相補的(例えば静電気)相互作用として反発する、荷電-荷電相互作用、双極子-双極子相互作用及び荷電-双極子相互作用が挙げられる。具体的には、阻害剤がRRFに結合した場合の阻害剤と酵素との間の全ての静電気相互作用を総合すると、結合のエンタルピーに対して中立的又は好適な貢献がなされる。

化合物のひずみ力及び静電相互作用を評価する特定のコンピュータソフトウェアが、当該分野で利用可能である。このような用途のために設計されたプログラムの例として、Gaussian 92 C, M. J. Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA 1992; AMBER, version 4.0 P. A. Kollman, University of California, San Francisco, 1994; QUANTA/CHARMM Molecular Simulations, Inc, San Diego, CA 1994等が挙げられる。これらのプログラムは、Silicon Graphics IRIS 4d/35又はIBM RISC/6000 Model550等の汎用コンピュータを用いて実行することができる。他のハードウェア及びソフトウェアは、当業者に公知である。

一度、RRF結合化合物が上記のように最適に選択又は設計されると、次にその結合特性を改善又は改変するためにその化合物の原子又は側鎖のいくつかについて、置換が行われる。一般に、最初の置換は保存的である。即ち置換基は元の基とほぼ同じ大きさ、形状、疎水性及び荷電を有する。当該分野で

コンホメーションを変えることが公知である化合物はさけるべきである。このように置換された化学的化合物は、次いで上記のコンピュータによる方法と同様にしてRRFに適合する効力について分析される。

本発明はまた、RRFの変異体を可能にし、そしてそれらの結晶構造の解明を可能にする。より詳細には、本発明により、RRFの結晶構造に基づくRRFの活性部位、補助的結合部位及び界面の位置により、変異のための所望の部位の同定が可能となる。

例えば変異は、野生型のRRFの部位、即ち活性部位又は補助的結合部位のみのうち、特定の部位又は組み合わせを指向することができる。あるいは変異誘発のために、界面部位上の位置が選択される。同様に、酵素表面上又は近傍の位置のみが置換され、野生型酵素と比較して1以上の荷電単位の表面荷電の変化を生じさせることができる。あるいはRRFのアミノ酸残基は、その親水性又は疎水性の特徴に基づいて選択され得る。

このような変異体は、野生型RRFと比較したいくつかの異なる特性のいずれかにより特徴づけられる。例えばこのような変異体は、1以上の荷電単位の表面荷電の変化を有し得るか、又はサブユニット解離に対する安定性の増加を有し得る。あるいはこのような変異体は、野生型RRFと比較して基質特異性の変化を有し得るか、あるいは野生型RRFよりも高いか、又は低い比活性を有し得る。

本発明により調製されるRRF変異体は、多くの方法により調製することができる。例えば野生型RRF配列は、本発明を利用して、変異に望ましいと同定された部位において、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発又は他の従来技術(例えば欠失等)手段により変異させることができる。あるいはRRFの変異体は、特定のアミノ酸の天然に存在しないアミノ酸での部位特異的置換により作成することができる。さらにRRF変異体は、アミノ酸残基、即ち特定のシステイン又はメチオニン残基のセレノシステイン又はセレノメチオニンとの置換により作製することができる。これは天然メチオニン又はシステインのいずれか(あるいは両方)を含まないが、セレノメチオニン又はセレノシステイン(あるいは両方)を富化した増殖培地上で野生型ポリペプチド又は変異体ポリペ

プチドのいずれかを発現することができる宿主生物を増殖させることにより達成される。

変異は、合成オリゴヌクレオチドを用いて、RRFをコードするDNA配列中に導入することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、所望の変異部位に隣接するヌクレオチド配列を含む。変異は、RRFの完全長DNA配列、他の生物のRRF又はRRF配列を短くしたり、長く(欠失又は付加)したものの配列中に作製することができる。

本発明に従って、上記の方法又は当該分野で公知の代替方法により作製される変異RRF DNA配列は、発現ベクターを用いて発現させることができる。当該分野で周知のように、発現ベクターは典型的には宿主ゲノムから独立した宿主細胞中での自己複製を可能にするエレメント、及び選択目的のための1つ以上の表現型マーカーを含む。発現ベクターはまた、所望のRRF変異体コード配列を囲むDNA配列のインサートの前又は後に、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル及び必要に応じてリプレッサー遺伝子ならびに終止シグナルをコードする調節配列を含む。いくつかの実施態様において、産生された変異体の分泌が求められる場合、シグナル配列をコードするヌクレオチドをRRF変異体コード配列の前に挿入することができる。調節配列の制御下での発現のためには、所望のDNA配列を調節配列に作動可能に連結させなければならない。即ち、RRF変異体をコードし、かつ調節配列の制御下のこの配列の発現及びこのRRF配列によりコードされる所望の産物の産生を可能にする適切なリーディングフレームを維持するDNA配列の前に適切な開始シグナルを有さねばならない。

広範な周知の利用可能な発現ベクターが、いずれも本発明の変異したRRFコード配列を発現するのに有用である。これらは例えばSV40の種々の公知の誘導体、公知の細菌プラスミド(例えばcol E1、pCR1、pBR322、pMB9及びそれらの誘導体を包含するE. Coli由来のプラスミド)、より広い宿主域のプラスミド(例えばRP4、ファージDNA(例えば多くの λ ファージの誘導体(例えばNM989)及び他のDNAファージ(例えばM13及び繊維状1本鎖DNAファージ))、2 μ プラスミド又はそれらの誘導体のような酵母プラスミドならびにプラスミド及び

ファージDNAの組み合わせから得られるベクター(例えばファージDNA又は他の発現コントロール配列を利用するために改変されているプラスミド)のような染色体DNA配列、非染色体DNA配列及び合成DNA配列のセグメントからなるベクターを包含する。本発明の好適な実施態様において、本発明者らはE. Coliベクターを利用している。

さらに、DNA配列に作動的に連結した場合、その発現を制御する、任意の広範な発現調節配列が、本発明による変異したDNA配列を発現するためにこれらのベクター中で使用される。このような有用な発現調節配列として、例えば動物細胞用SV40の初期プロモーター及び後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系又はTRC系、fdコートタンパク質の λ ファージ調節領域の主要なオペレーター領域及びプロモーター領域(全てE. Coli用)、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の糖分解酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター(例えばPho5)、酵母用酵母 α -交配因子のプロモーター及び原核生物細胞又は真核生物細胞あるいはウイルスの遺伝子発現を制御することが公知である他の配列及びこれらの組み合わせが挙げられる。本発明の好適な実施態様において、本発明者らは、E. Coli発現を利用する。

広範な種の宿主が又、本発明による変異RRFの産生に有用である。これらの宿主として、例えばE. Coli, Bacillus及びStreptomycesのような細菌、酵母のような真菌、CHO細胞及びCOS-1細胞のような動物細胞、植物細胞及びトランスジェニック宿主細胞が挙げられる。好適な実施態様において、宿主細胞はE. Coliである。

全ての発現ベクター及び発現系が、本発明の変異DNA配列を発現し、そして改変RRF又はRRF変異体を産生するのに、同じ様式で機能するとは限らないことを理解すべきである。全ての宿主が同一の発現系を用いて等しく良好に機能するわけではない。しかし、当業者は、実験を行うことなく、そして本発明の範囲を逸脱することなく、これらのベクター、発現調節配列及び宿主から選択することができる。例えば、ベクターの選択の際に重要な考慮事項は、所定の宿主におけるベクターの複製能力である。ベクターのコピー数、コピー数の制御能力及び抗生物質マーカーのような、ベクターによりコードさ

れる他のタンパク質の発現も又考慮しなくてはならない。

発現調節配列の選択の際、種々の要因も考慮に入れるべきである。これらは、例えば系の相対的強度、その制御能力、本発明の改変RRFをコードするDNA配列の適合性、特に潜在的二次構造に関する適合性である。

宿主は、選択されたベクターとの適合性、宿主に対する改変RRFの毒性、成熟産物を分泌する能力、タンパク質を適切に折り畳む能力、発酵要求性、宿主からの改変RRFの精製の容易さ及び安全性の考察により選択されるべきである。これらのパラメータ内で、当業者は有用な量の変異RRFを産生することができる、種々のベクター／発現調節系／宿主の組み合わせを選択することができる。

これらの系で産生される変異RRFは、野生型RRFを精製するために使用される工程及びストラテジーを包含する種々の従来の工程及びストラテジーにより精製することができる。

一度、RRF変異が所望の位置(即ち、活性部位又は補助的結合部位)で作製されると、変異体を目的のいくつかの特性いずれかについて試験することができる。

例えば変異体は、生理学的pHにおける荷電の変化についてスクリーニングすることができる。これは野生型親の等電点(pI)と比較した変異RRFの等電点を測定することにより決定される。等電点は、Wellner, D. *Analyt. Chem.* 43. p597 (1971)の方法によるゲル電気泳動により測定される。表面荷電が変化した変異体は、本発明の構造情報により提供されるように、酵素の表面に位置する置換アミノ酸及び変化したpIを有するRRFポリペプチドである。

さらに変異体は、野生型RRFと比較して高いか、又は低い比活性についてスクリーニングすることができる。変異体は、平島及び梶の方法及びオリゴヌクレオチドを用いるアッセイ(前出)を用いて活性測定される。変異体は上記のようにRRF反応を測定することにより、RRF基質特異性の変化を試験することができる。

さらに本発明の目的は、安定性の上昇した変異体を包含する。安定性が上昇したRRF変異体は、酵素活性の喪失を示さないものも含む。

以下、実施例により本発明をより詳細に示す。以下に示す実施例はあくまでその詳細な解説を目的とするものであり、他の方法を制限するものではない。

[実施例]

例1. 滴状蒸気拡散法 (hanging drop vapour diffusion technique) による菌XのRRFタンパクの結晶化

菌XのRRFタンパク4mg/mlから8mg/ml、トリス塩酸 50mM pH8.5、硫酸塩 70-100mM、ポリエチレングリコール14%から18%を含む5 μ lの溶液を液滴化し、液滴よりも高い濃度の結晶化試薬を含有する液だまりで平衡化した。平衡化は揮発性媒体(水又は有機溶媒)の拡散により、液滴の蒸気圧が液だまりの蒸気圧に等しくなるまで行った。平衡化が水交換(液滴から液だまりへ)によりおきると、液滴の容量は変化する。その結果、液滴中の全ての媒体の濃度は変化する。水よりも高い蒸気圧を有する媒体には、液だまりから液滴への変換が生起する。本例においてRRFタンパク溶液が接触するガラス容器は、その表面を疎水化処理して用いられる。トリス塩酸 100mM pH8.5硫酸塩150mMから200mM、ポリエチレングリコール28%から36%の緩衝液へ透析してXRRF結晶を得た。結晶は、1から3週間で 30 \times 50 \times 250 μ mの大きさに成長した。その結果を図1に示す。

例2. X線回折解析によるRRFの三次元構造

RRF三次元構造決定の手段として、複合同位体置換法 (multiple isomorphous replacement procedure) を用いた。これは、重原子による同位体タンパク結晶からの拡散データを得るのに必要な標準的な方法である。重原子の位置より、未置換のものと同位体との差をパターンソン・マップへ計算した。タンパクモデル作成にあたり電子密集度図の計算に必要な初期タンパク相のデータは、数種の誘導体を用いて計算された。

この凍結結晶のX線回折のデータは、MaxII synchrotron (Sweden, Lund) によりBL71へ集めた。

そのネイティブな結晶は2.6Åの解像度で回折した。1.5以上のモザイシティの問題の為に、現在までの所2.9Åの解像度までを用いた。この典型的な回

折像を図2に示す。

このネイティブデータ解析は終了しており、Rsymが1.0である。この統計データを表1に示す。

この結晶は、 $a=98.5\text{ \AA}$ 、 $b=106.7\text{ \AA}$ 、 $c=66.7\text{ \AA}$ を有し、 $P2_12_12_1$ に属している。

この非対称のユニットは2から4分子を含んでおり、各分子間には0.5、0.33、0.5のトランスレーションが存在する。2つの誘導体のデータが得られ、プラチナの誘導体は 4.0 \AA に回折し、水銀の誘導体は 3.8 \AA に回折した。

ネイティブデータの統計学的検討

回折強度の要約とR-因子をシェルの大きさ(解像度)により示した表

Rの値(一次関数として) $=3D \text{ SUM } (\text{ABS}(I - \langle I \rangle)) / \text{SUM } (I)$

Rの値(二次関数として) $=3D \text{ SUM } ((I - \langle I \rangle) ** 2) / \text{SUM } (I ** 2)$

カイ自乗 $=3D \text{ SUM } ((I - \langle I \rangle) ** 2) / (\text{エラー} ** 2 * N / (N-1)))$

全ての和の計算には二度以上測定した値についてのみ行った。

表 1

シェルの下限及び上限 オングストローム		回折強度の		平均の	正常の	一次乗数の	二次乗数の
<u>下限</u>	<u>上限</u>	<u>平均</u>	<u>誤差</u>	<u>stat. 値</u>	<u>カイ自乗値</u>	<u>R-因子</u>	<u>R-因子</u>
30.0	7.12	814.6	36.6	18.5	0.709	0.033	0.032
7.12	5.67	227.1	16.7	13.5	1.012	0.084	0.072
5.67	4.95	266.0	19.0	15.3	0.983	0.083	0.075
4.95	4.50	417.3	25.3	18.4	1.052	0.070	0.064
4.50	4.18	394.0	25.5	19.6	1.239	0.087	0.086
4.18	3.93	330.4	24.4	19.7	1.064	0.093	0.088
3.93	3.74	296.1	24.6	20.9	1.286	0.125	0.219
3.74	3.58	283.8	25.5	22.0	1.275	0.142	0.221
3.58	3.44	207.5	23.2	21.2	1.314	0.170	0.192
3.44	3.32	173.2	22.5	21.1	1.278	0.193	0.298
3.32	3.22	151.8	22.1	20.9	1.414	0.222	0.231
3.22	3.12	130.4	21.7	20.8	1.560	0.265	0.280
3.12	3.04	108.3	20.6	19.9	1.552	0.306	0.307
3.04	2.97	92.2	19.9	19.2	1.655	0.334	0.315
2.97	2.90	74.9	19.2	18.7	1.632	0.411	0.416
全ての反射		268.4	23.2	19.3	1.259	0.119	0.102

例3. *Thermotoga Maritima*のRRFの結晶構造

*Thermotoga Maritima*のRRF cDNAを発現ベクター(PET1650)にクローン化し、IPTG添加により*E. Coli*で発現させた。結果として宿主細胞中に*Thermotoga Maritima* RRFが高レベルで蓄積した。細胞を機械的に破壊し、平島と梶の方法(Biochemistry, 11, 4037, (1972))を改変した方法で精製し、*Thermotoga Maritima* RRFを得た。RRFの結晶を蒸気拡散により成長させた。5-10 μ lのRRF溶液を同量のreservoir液(0.1M 酢酸ナトリウム、(pH5.5)2.0M 硫酸、5mM DTT、10%グリセロール)と混合し、600 μ lの上記reservoir液と25℃で平衡化し、24時間この液をストリークして、結晶形成を促進すると、結晶が15時間後には見られる。そして3日後には、0.3×0.3×0.5mmのbipyramidal型の結晶に成長した。

当業者にとって、上述の結晶化条件を適宜改変することが可能である。

全てのX線データセット(2.55 Å分解能)をビームラインBL711において、MAX IIシンクロトロンを用いてMar345イメージプレートディテクターに集めた。データのマージ、スケール、インデックス化及び積分は、VDS及びXscale(Kabsch, W. J. Appl. Crystallography 26 795 (1993))のプログラムを用いて行った。MADデータ(multiwavelength anomalous dispersion data)は、波長0.9184~0.978 Å及び0.9788 Åにおいて、ビームラインBM14 ESRFにて行い、Mar345イメージプレートディテクターを用いて集めた。このデータをMosflm(Leslie, A. G. W. in Crystallographic computing Oxford Univ Press (1990))を用いて処理し、スケール、マージはScala(CCP4)中にて行った。

セレンウム原子のRRF中における位置は、shelxプログラム(sheldrick, G. M. Acta Cryst. A46 P467 (1998))を用い、normalizeされた構造因子を用いた。重原子(セレンウム)パラメーターは、MIphase(CCP4)を用いて精密化した。電子密度地図を空間群P4₁2₁2及びP4₃2₁2の両方で求めてみたところ、正しい空間群は、P4₃2₁2であることが明らかとなった。平均メリット値は、0.66 Å⁻¹~4.0 Å⁻¹の分解能を示した。表2は*Thermotoga Maritima* RRFの結晶データを示す。

表2

データコレクション	
最高分解能シェル2.65 - 2.55 Åに関する値	
分解能	30-2.55
全測定回数	79947 (7119)
特異的反射屈折	11927 (1261)
平均反復数	6.7 (5.6)
R_{syn} (%)	0.049 (0.156)
データの完成度 (%)	99.8 (99.1)
$I/\sigma(I)$	26.4 (8.9)

$R_{\text{merge}} = (\sum |I - \bar{I}| / \sum I)$ 式中、 I は観察された強度であり、 \bar{I} は中心対称性反射の平均強度である。
カッコ内はmaximum resolutionの場合の値を示す。

溶媒平滑化(solvent flattening)及び位相拡張(CCD4-collaborative computing project #4, A suite of program for protein crystallography Daiesburg Laboratory, Warrington, WA4 4. AD UK (1979)により、マップを改良し、完全なポリペプチド鎖をトレースすることに成功した。モデル構築プログラム(Jones, A. T et al Acta. Cryst. A47 PP110(1991))位置の精密化((CNS)Branger A. T et al Acta Cryst D54 p905 (1998))及び位相の積分(phase combination)を繰り返し、全ての側鎖をモデルに導入することができた。rigid body及び位置の(positional)精密化を行い、さらに擬似アニーリング(simulated annealing)を行った。このモデルを結晶データ(Native Data)と照合してモデルの位相のみを用いて最終モデルに到達した。

本発明によるRRFのモデルは、全てのX及びY軸の観察されたデータに対してR因子(25.3%)を有する。理想結合長及び結合角からの二乗平均平方根は偏差は0.01 Å及び2.0 Åである。

表3は、Thermotoga Maritima RRF結晶データの統計学的処理結果を示す。

表3

データコレクション		データセット (波長Å)			インフレーション (0.9788)		リモート (0.9184)	
ピーク (0.9786)								
分解能 (Å)	2.9				2.9		2.9	
完成度 (%)	99				98		98	
Rsym (%)	7.0				7.0		7.2	
Cullis R-centric	0.67				0.56		-	
Cullis R-anomalous	0.60				0.77		0.78	

表4は、*Thermotoga Maritima* RRFのPhasingを示す。

分解能 フェージン グ(Phasing)		表4				
解像度bin (Å)	30-11.5	11.5 - 8.1	8.1 - 6.2	6.2 - 5.1	5.1 - 4.3	4.3 - 3.7
FOM	0.704	0.732	0.745	0.683	0.623	0.58
Mean FOM	0.66					

2. RRFの活性部位の推定

RRF分子中の活性部位の位置を推定するために、一連のRRF変異体を生成した。変異誘発を誤りの多いPCR法を用いて、変異を導入した(Janos *et al* *EMBO J.* **17** 1141 (1998))。

致死遺伝子変異を有するfrr(RRFをコードする遺伝子)を持つプラスミドの分離は次のようにして行った。Janosi等による*EMBO J.* **17** 1141 (1998)に記載されているpMIXを用いた。簡単に説明するとpMIXは、frrに様々な遺伝変異を起こさせ、それをクロラムフェニコール耐性のプラスミドに導入させたものである。この実施例では、大腸菌のLJ4(recA-)を宿主として用いた。この菌はクロモゾーム上のfrrがフレームシフトのために不活性化されているため、大腸菌はpPEN(1560) (Janosiら*EMBO J.* **17** 1141 (1998))上にある野生型frrにより生命を保っている。pPEN(1560)は、カナマイシン耐性因子及びショ糖過敏遺伝子(sucrose sensitivity gene)を含む。

この大腸菌をpMIXでトランスフォームし、クロラムフェニコール耐性をマーカーとして選別した。frrは細菌にとって不可欠であるので、pMIXの中に致死変異のあるfrrを持った菌は、上記pPEN1560を持たないと生きて行けない。従ってpMIXとpPEN1560の両方のプラスミドを有する菌を探した。因みにpMIXとpPEN1560の両プラスミドは、通常はincompatibleなので共棲しないが、上記のように必要に迫られれば(抗生物質マーカー及びfrrの必要性)共棲する。

このような大腸菌を選択するために、トランスフォーマントをCM及びショ糖を含むプレート上にまき、さらにCMとKMを含むプレートにレプリカフレイ

ティングする。後者に生育し、前者に生育しない菌を選択するとpPEN1560とpMIX中のlethal frrを持っている菌を選べる。この菌はpPEN1560を有するからショ糖を含むプレートには生えない。かくして得られた153個のトランスフォーマントからそれぞれのプラスミドを純化し、それを用いて大腸菌DH5 α (wild type frrを有する)をトランスフォームした。この菌は上述のごとく野生型のfrrを有するのでpPEN1560(カナマイシン耐性)を必要としない。従ってクロラムフェニコール、カナマイシン感受性の大腸菌DH5 α を選べば、lethal mutationを持ち、pMIXを有する大腸菌を選択することができる。

かくして得られた大腸菌からプラスミドを単離し、KpnI-HindIIIフラグメント(0.9kb, frr)を取り出して常法によるDNA配列決定を行った。その結果を表5に示す。

表5

RRFを不活化する遺伝変異

変異型	Allele	分離した株数	ヌクレオチド変異	RRFのプライマリー配列中の変異	記
1アミノ酸変化	<i>fr146</i>	1	T(152)C	Leu(51)Pro	.
	<i>fr160</i>	1	T(161)C	Leu(54)Pro	.
	<i>fr161</i>	1	T(194)C	Leu(65)Pro	.
	<i>fr109</i>	1	T(99)C T(194)C	Leu(65)Pro	Ser(33)サイレント
	<i>fr106</i>	1	C(123)T G(329)A	Arg(110)His	Val(41)サイレント
	<i>fr119</i>	3	C(-91)A C(385)T	Arg(129)Cys	プロモーターを含む
	<i>fr114</i>	1	C(394)G	Arg(132)Gly	.
	<i>fr132</i>	1	C(394)T	Arg(132)Cys	.
	<i>fr133</i>	1	G(395)A	Arg(132)His	.
	<i>fr138</i>	1	G(395)A	Arg(132)Gln	.
	<i>fr124</i>	2	T(524)C	Leu(175)Pro	.
	<i>fr149</i>	2	C(447)T T(524)C	Leu(175)Pro	Ser(149)サイレント
	<i>fr165</i>	1	G(28)A A(490)C	Glu(10)Lys	.
2アミノ酸変化	<i>fr113</i>	1	G(28)C G(162)A A(490)C	Thr(164)Pro	.
	Bクラス	1	T(38)C T(512)C	Thr(164)Pro	Leu(154)サイレント
		1	T(107)A C(317)A	Ile(171)Thr	.
		2	A(269)G G(329)A	Thr(106)Lys	.
	<i>fr118</i>	1	T(14)C A(103)G T(194)A	Arg(110)His	.
3アミノ酸変化	<i>fr134</i>	1	T(14)C A(103)G T(194)A	Ser(35)Gly	Leu(65)Glu
	<i>fr141</i>	1	G(88)A T(97)C C(394)T	Ser(33)Pro	Arg(132)Cys
C末端が短くなったもの	<i>fr127</i>	1	G(52)T T(416)C	Glu(18)stop (17 AA long RRF)	+mutation beyond stop
	<i>fr123</i>	1	A(76)T	Lys(26)stop (25 AA long RRF)	.
	<i>fr158</i>	1	C(135)G	Tyr(45)stop (44 AA long RRF)	.
	<i>fr125</i>	1	C(157)T	Gln(53)stop (52 AA long RRF)	.
	<i>fr162</i>	1	T(24)C C(157)T	Gln(53)stop (52 AA long RRF)	.
	<i>fr140</i>	1	A(196)T T(206)C	Gln(53)stop (52 AA long RRF)	Asp(8)サイレント
	<i>fr110</i>	1	C(218)A	Ser(73)stop (72 AA long RRF)	+2 mutations beyond stop
	<i>fr131</i>	1	C(-6)A C(218)A	Ser(73)stop (72 AA long RRF)	.
	<i>fr108</i>	1	G(364)T A(540)G	Glu(122)stop (121 AA long RRF)	SD-開始スベーカーを含む
	Dクラス	1	G(52)T T(416)C	Glu(18)stop (17 AA long RRF)	.
		1	A(76)T	Lys(26)stop (25 AA long RRF)	.
	<i>fr158</i>	1	C(135)G	Tyr(45)stop (44 AA long RRF)	.
	<i>fr125</i>	1	C(157)T	Gln(53)stop (52 AA long RRF)	.
	<i>fr162</i>	1	T(24)C C(157)T	Gln(53)stop (52 AA long RRF)	.
	<i>fr140</i>	1	A(196)T T(206)C	Gln(53)stop (52 AA long RRF)	.
	<i>fr110</i>	1	C(218)A	Ser(73)stop (72 AA long RRF)	.
	<i>fr131</i>	1	C(-6)A C(218)A	Ser(73)stop (72 AA long RRF)	.
	<i>fr108</i>	1	G(364)T A(540)G	Glu(122)stop (121 AA long RRF)	.

表5の続き

<i>frr117</i>	1	A(430)T	Lys(144)stop (143 AA long RRF)	-	Asp(112)サイレント
<i>frr136</i>	1	T(336)C A(430)T	Lys(144)stop (143 AA long RRF)	-	+プロモーター及びSD間の変異
<i>frr159</i>	1	T(-46)C A(508)T	Lys(170)stop (169 AA long RRF)	-	
<i>frr142</i>	3	G(514)T	Glu(172)stop (171 AA long RRF)	-	
C末端が短く					
<i>frr115</i>	2	A(103)G C(157)T	Ser(35)Gly	Glu(53)stop (52 AA long RRF)	-
なったもの及び					
<i>frr151</i>	1	(A11)G G(364)T	Asp(4)Gly	Glu(122)stop (121 AA long RRF)	-
Iアミノ酸変化					
<i>frr140</i>	1	A(61)G C(367)T	Lys(21)Glu	Glu(123)stop (122 AA long RRF)	-
<i>frr166</i>	1	A(61)G G(162)A C(367)T	Lys(21)Glu	Gln(123)stop (122 AA long RRF)	Leu(154)サイレント
Eクラス					
<i>frr121</i>	1	A(445)G C(469)T	Ser(149)Gly	Gln(157)stop (156 AA long RRF)	-
<i>frr152</i>	1	C(467)T C(469)T	Ser(156)Phe	Gln(157)stop (156 AA long RRF)	-
<i>frr139</i>	1	C(467)T C(469)T	C(555)T Ser(156)Phe	Gln(157)stop (156 AA long RRF)	mutation beyond stop
フレームシフト					
<i>frr170</i>	1	T(5)del	Stop at nt 50-52	(16 AA long RRF)	Ser(3) to (Cys(16) changed
によりC末端が					
<i>frr101</i>	1	G(40)del	Stop at nt 50-52	(16 AA long RRF)	Asp(14) to Cys(16) changed
短くなったもの					
<i>frr169</i>	1	A(70)del	Stop at nt 170-172	(56 AA long RRF)	Ile(24) to Ser(56) changed
<i>frr143</i>	1	A(79)del	Stop at nt 170-172	(56 AA long RRF)	Ile(27) to Ser(56) changed
<i>frr129</i>	1	C(75)del	Stop at nt 170-172	(56 AA long RRF)	Ser(25) to Ser(56) changed
<i>frr126</i>	1	C(101)del A(419)T	Stop at nt 170-172	(56 AA long RRF)	Ser(35) to Ser(56) changed
Fクラス					+mutation beyond stop
<i>frr105</i>	1	T(170)del A(359)T T(492)C	Stop at nt 176-178	(58 AA long RRF)	Val(57) to Thr(58) changed
<i>frr147</i>	1	CG(82-83)del	Stop at nt 210-212	(69 AA long RRF)	+2 mutations beyond stop
<i>frr153</i>	1	AT(199-200)C	Stop at nt 266-268	(88 AA long RRF)	Arg(28) to Val(69) changed
<i>frr107</i>	1	A(333)del	Stop at nt 338-340	(112 AA long RRF)	Ile(67) to Gly(88) changed
<i>f103</i>	1	C(362)del	Stop at nt 416-418	(138 AA long RRF)	Asp(112) changed
<i>frr137</i>	1	A(346)del A(363)GA(501)G	Stop at nt 416-418	(138 AA long RRF)	Ala(121) to Lys(138) changed
<i>frr145</i>	1	A(389)del	Stop at nt 416-418	(138 AA long RRF)	Ile(116) to Lys(138) changed
<i>frr135</i>	1	A(511)del	Stop at nt 545-547	(181 AA long RRF)	+mutation in shifted sequence
					+mutation beyond stop
					Asn(130) to Lys(138) changed
					Ile(168) to Glu(181) changed

ヌクレオチド変異及びアミノ酸変異：変異部位は野生型ヌクレオチド又はアミノ酸の位置番号により示した。アミノ酸は3文字表記で示した。略号：AA=アミノ酸、del=欠失

この表に示すように61個の株が得られ、これは53個の異なったゲノタイプを有した。かくして分離された致死遺伝子を有するプラスミドは、frrとして機能しないことを温度感受性RRFを有するLJ4(JanosíらEMBO J 17 1141 (1998))を用いて確認した。得られた全てのプラスミドはLJ4の生育を42℃で支持できなかった。

次にfrrの構造遺伝子のうち、frrの機能に影響を与えないアミノ酸変異の分離法を記述する。この目的のために宿主としてLJ4を用いた。この宿主は、前述のごとくクロモソーム上のfrrは機能しないので、frr14を有するプラスミドpKH6により27℃で存在し得る。

この大腸菌は、frr14(温度感受性のRRFをコードする)により存命しているので当然温度感受性である。この大腸菌を自然のreversion rateにまかせて27℃で生育すると 4.2×10^{-6} の割合で42℃に生育するものが得られた。この大腸菌のうち、プラスミドをtsfrr(pKH6)を有するものに置き換えると再び温度感受性になるものを選び、常法によりfrr部分のDNA配列を決定した。得られた全てのfrrでは、frrの遺伝変異Val 117 Aspは、野生型のバリンに戻っていたがそのうち数種は、117位以外のアミノ酸部位に変異が見られた。これらの変異はfrrの機能に全く影響が見られなかった。この変異を表6に示す。

表6

RRF遺伝子の温度感受性をもとに戻す遺伝変異

Allele	表現型質	分離した株数	ヌクレオチドの位置					アミノ酸基の位置					記
			350	457	458	511	513	117	153	171			
<i>frr</i>	<i>wt</i>	NA	T	G	A	A	T	Val	Asp	Ile	(222)		
<i>frr14</i>	<i>ts</i>	NA	A	G	A	A	T	Asp	Asp	Ile	(2785)		
<i>frr201</i>	tr revertant	2	T	G	A	A	T	Val	Asp	Ile	-		
<i>frr206</i>	tr revertant	3	T	T	A	T	T	Val	Tyr	Phe	-		
<i>frr204</i>	tr revertant	1	T	T	A	T	A	Val	Tyr	Leu	-		
<i>frr202</i>	tr revertant	3	T	G	A	T	A	Val	Asp	Leu	-		
<i>frr203</i>	tr revertant	1	T	G	A	A	A	Val	Asp	Ile	Ile(171)サイレント		
<i>frr205</i>	tr revertant	4	T	G	C	T	T	Val	Ala	Phe			

アミノ酸は3文字表記とした。略号：NA=—、wt=野生型、ts=温度感受性、tr=温度耐性

3. RRFの作用機作の推定

図2に示すRRFのリボンによる描画、図3に示す空間充填モデル等からRRFが転移RNAに類似した形状及びサイズを有することが判明した (Selmer, M., Al-Karadaghi, S., Hirokawa, G., Kaji, A. & Liljas, A. *Science* 286, 2349-2352 (1999))。従って、RRFは転移RNAと類似の挙動を示すことにより、蛋白質翻訳終結複合体解離活性を発現する可能性が示唆される。具体的には、RRFの作用機作に関し、図5に示すモデルが示唆される。

まず、転移RNA 2a、2b、メッセンジャーRNA 3及びリボソーム1からなる終結複合体6 (a) のアミノアシル部位 (A部位) にRRF 4が結合する。RRF 4には、GTPを伴ったEFG 5が結合している。又、リボソーム1のペプチジル部位 (P部位) 及び放出部位 (exit site) (E部位) には、それぞれ転移RNA 2a、2bが結合している (b)。次に、リボソーム依存的なGTPの加水分解及びA部位に結合したRRF 4のP部位へのトランスロケーションが、EFG 5によって引き起こされる。同時に、E部位に結合していた転移RNA 2bの遊離及びP部位に結合していた転移RNA 2aのE部位への移動を経た遊離が起こり、結局、2分子の転移RNAが放出される (c)。最後に、RRF 4及びEFG 5のリボソーム1からの遊離に続き、リボソーム1がメッセンジャーRNA 3から放出されて、終結複合体6の解離が終了する (d)。

このモデルによる仮説を検証すべく以下の実験を行った。

例4. アミノグリコシド類によるRRF活性の阻害

ストレプトマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシン等のアミノグリコシド類は、リボソームのA部位に結合することにより、転移RNAのA部位への結合を阻害することが知られている (Moazed, D. & Noller, H. F. *Nature* 327, 389-394 (1987) ; Fourmy, D., Yoshizawa, S. & Puglisi, J. D. *J. Mol. Biol.* 277, 333-345 (1988) ; Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. *EMBO J.* 17, 6437-6448 (1988))。従って、図5のモデルに従えば、上記のアミノグリコシド類はRRFのA部位への結合をも阻害するはずであり、かかる結合が阻害されれば、RRFによる終結複合体の解離プロセスも阻害されるはずである。

そこで、上記のアミノグリコシド類の存在下において終結複合体の解離プロセスが阻害されるか否かを、リボソームから遊離する転移RNAの量及びメッセンジャーRNAから遊離するリボソームの量を指標として調べた。

リボソームからの脱アシル化転移RNAの遊離は以下の方法にて調べた。

テトラサイクリンで処理した *E. coli* Q13株から得たポリソーム (Hirashima, A. & Kaji, A. J. Mol. Biol. 65, 43-58 (1972)) (0.6 ~ 1.8 A₂₆₀ ユニット) を、275 μ M のピューロマイシン、0.2 nmol の RRF、0.2 nmol の EFG (Kaziro, Y., Inoue-Yokosawa, N. & Kawakita, M. E. coli. J. Biochem. 72, 853-863 (1972)) 及び 0.37 mM の GTP の存在下、550 μ l のバッファー R (トリス-Cl 10 mM、pH 7.4、硫酸マグネシウム 8.2 mM、塩化アンモニウム 80 mM、ジチオスライトール (DTT) 0.14 mM) 中において、30°C で 15 分間インキュベートした。次に、アミノグリコシド類として、ストレプトマイシン、パロモマイシン又はゲンタマイシンを、それぞれ 200 μ M、100 μ M、100 μ M となるように添加した。次いで、Microcon 100 (Millipore 社製、商標名) を用いて、330 G で 40 分間遠心することにより、遊離した転移RNAを終結複合体と分離した。次に、上記の Microcon 100 にバッファー J (トリス-Cl 10 mM、pH 7.6、硫酸マグネシウム 10 mM、塩化アンモニウム 50 mM、DTT 0.5 mM) を 550 μ l 注ぎ、遠心することにより、フィルターを一回洗浄した。この洗浄液を濾液と合わせたものを、Microcon 30 (Millipore 社製、商標名) を用いて、14000 G で 15 分間、2 回遠心することにより、14 μ l に濃縮した。次いで、濃縮した転移RNAを、30 μ l の緩衝液 (トリス-Cl 50 mM、pH 7.8、酢酸マグネシウム 10 mM、 β -メルカプトエタノール 6 mM、ATP 3 mM、ホスホエノールピルビン酸 5 mM、ピルベートキナーゼ 138 μ g、アミノアシル転移RNA合成酵素 33.3 μ g (Momose, K. & Kaji, A. Arch. Biochem. Biophys. 111, 245-252 (1965))) に溶解した ¹⁴C-アミノ酸混合物 (Amersham 社製、炭素原子 1 mg 当たり 52 mCi)、0.15 μ Ci に

てアミノアシル化した。このようにして得られた冷トリクロロ酢酸 (4℃) に不溶の放射活性は¹⁴C-アミノアシル転移RNAに相当し、その量を、同一の方法で標識した既知量の転移RNAの放射活性に基づいて算出した。尚、アミノグリコシド類は、Sigma社製のものを用いた。又、終結複合体は、ピューロマイシンで処理した*E. coli*の天然ポリソームから得た (Hirashima, A. & Kaji, A. J. Biol. Chem. 248, 7580-7587 (1973))。単離したポリソーム中の各リボソームはトランスロケーション終了後の段階にあり、概ね2分子の転移RNAを担持していることが分かっている (Remme, J., Margus, T., Villems, R. & Nierhaus, K. H. Eur. J. Biochem. 183, 281-284 (1989); Stark, H. et al. Cell 88, 19-28 (1977))。

結果を図6に示す。図6中、ポジティブコントロールは、アミノグリコシド類を添加せずに、RRF、EFG及びGTPを添加した場合の値であり、ネガティブコントロールは、アミノグリコシド類、RRF、EFG及びGTPのいずれをも添加しなかった場合の値である。

メッセンジャーRNAからのリボソームの遊離は以下の方法にて調べた。

前記のポリソーム (0.5~0.8 A₂₆₀ユニット) を、275 μMのピューロマイシン、1 nmoleの精製RRF (Hirashima, A. & Kaji, A. Biochemistry 11, 4037-4044 (1972))、1 nmoleのEFG³²、0.37 mMのGTP及びアミノグリコシド類の存在下、270 μlのバッファーR中において、30℃で15分間インキュベートした。アミノグリコシド類は、ストレプトマイシン、パロモマイシン又はゲンタマイシンを、それぞれ100 μM、5 μM、5 μMとなるように添加した。次いで、バッファーJ中の、15~30%の密度勾配を設けたショ糖5 mlの上に、インキュベートした上記の緩衝液を積層し、Beckman SW50.1を用い、40000 rpm、75分間、4℃の条件で遠心した。254 nmでの吸光度をISCO

UA-6ディテクターにてモニターし、遊離の70Sリボソームの濃度を測定した。結果を表7に示す。尚、表7中の値は、アミノグリコシド類の存在下で遊離した70Sリボソームの濃度を、アミノグリコシド類を加えなかった場合 (コントロール) の遊離の70Sリボソームの濃度に対するパーセ

ンテージで表したものである。又、コントロールにおいては、全リボソーム（ポリソームのほぼ90%を占める。）の約42%がRRFによってモノソームに変換されていた。

表7 各種阻害剤存在下における、RRFとEF-Gによる、mRNAからのリボソームの遊離

阻害剤	濃 度	RRFによる、mRNAからの リボソームの遊離 (コントロールに対する%)
コントロール	-	100*
パロモマイシン	5 μ M	16.5
ゲンタマイシン	5 μ M	0
ストレプトマイシン	100 μ M	9.9
チオストレプトン	20 μ M	0
バイオマイシン	50 μ M	0
フシジン酸	200 μ M	0
GMPPCP	370 μ M****	0

図6より、アミノグリコシド類の存在下では、転移RNAの遊離がネガティブコントロールと同等以下の値に阻害されることがわかる。又、表7より、アミノグリコシド類の存在下では、リボソームの遊離も阻害されることがわかる。これらの結果より、RRFの活性の発現にはRRFがリボソームのA部位に結合することが必要であることが強く示唆され、従って、RRFのA部位への結合を阻害する物質はRRF阻害剤の有力な候補となり得ると考えられる。

例5. チオストレプトン及びバイオマイシンによるRRF活性の阻害

チオストレプトン及びバイオマイシンは、共にEFG阻害剤であり、転移RNAのトランスロケーションを阻害することが知られている (Pestka, S. B

iochem. Biophys. Res. Commun. 40, 667-674 (1970); Rodnina, M. V., Savel'sbergh, A., Katunin, V. I. & Wintermeyer, W. Nature 385, 37-41 (1997); Rodnina, M. V. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9586-9590 (1999)). 従って、図5のモデルに従えば、チオストレプトン及びバイオマイシンは、A部位に結合したRRFのP部位へのトランスロケーションをも阻害するはずであり、そうであればトランスロケーションに伴って起こるはずのP部位及びE部位からの転移RNAの遊離、ひいてはRRFによる終結複合体の解離プロセスも阻害されるはずである。そこで、チオストレプトン又はバイオマイシンの存在下において終結複合体の解離プロセスが阻害されるか否かを、リボソームから遊離する転移RNAの量及びメッセンジャーRNAから遊離するリボソームの量を指標として調べた。

リボソームからの転移RNAの遊離は、アミドグリコシド類の代わりにチオストレプトン (Sigma社製) 又はバイオマイシン (ICN社製) を添加した点を除いては例4と同じ方法にて調べた。チオストレプトン及びバイオマイシンは、それぞれ100 μ M、200 μ Mとなるように添加した。結果を図6に示す。

又、メッセンジャーRNAからのリボソームの遊離は、アミドグリコシド類の代わりにチオストレプトン又はバイオマイシンを添加した点及びチオストレプトンを添加した場合には、反応混合物に0.06%になるようにDM SOを添加した点を除いては例4と同じ方法にて調べた。チオストレプトン及びバイオマイシンは、それぞれ20 μ M、50 μ Mとなるように添加した。結果を表7に示す。

図6より、チオストレプトン又はバイオマイシンの存在下では、転移RNAの遊離がネガティブコントロールと同等の値に阻害されることがわかる。又、表7より、チオストレプトン又はバイオマイシンの存在下では、リボソームの遊離が完全に阻害されることがわかる。これらの結果より、RRFの活性の発現にはA部位に結合したRRFのP部位へのトランスロケーションが必要であることが強く示唆され、従って、RRFのトランスロケーションを阻害する物質はRRF阻害剤の有力な候補となり得ると考えられる。

例6. GMP P C P及びフシジン酸による終結複合体解離の阻害

—GMP P C P及びフシジン酸は、共にE F G阻害剤であり、転移RNAのトランスロケーション後にE F Gをリボソームに固定することにより終結複合体の解離を阻害する一方、転移RNAのトランスロケーションが起こるのを1回だけ許容することが知られている (Inoue-Yokosawa, N., Ishikawa, C. & Kaziro, Y. J. Biol. Chem. 249, 4321-4323 (1974); Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I. & Wintermeyer, W. Nature 385, 37-41 (1997); Bodley, J. W., Zieve, F. J., Lin, L. & Zieve, S. T. J. Biol. Chem. 245, 5656-5661 (1970); Kuriki, Y., Inoue, N. & Kaziro, Y. Biochim. Biophys. Acta. 224, 487-497 (1970)). 従って、図5のモデルに従えば、GMP P C P及びフシジン酸は、A部位に結合したR R FのP部位へのトランスロケーションを許容するため、トランスロケーションに伴って起こるP部位及びE部位からの転移RNAの遊離は阻害しないはずである。一方、GMP P C P及びフシジン酸は終結複合体の解離を阻害するため、メッセンジャーRNAからのリボソームの遊離は阻害するはずである。そこで、GMP P C P又はフシジン酸の存在下において、リボソームからの転移RNAの遊離及びメッセンジャーRNAからのリボソームの遊離が阻害されるか否かを調べた。

リボソームからの転移RNAの遊離は、アミドグリコシド類の代わりにGMP P C P (Sigma社製) 又はフシジン酸 (ICN社製) を添加した点及びGMP P C Pを添加した場合にはGTP非存在下で実験を行った点を除いては例4と同じ方法にて調べた。GMP P C P又はフシジン酸は、それぞれ370 μ M、200 μ Mとなるように添加した。結果を図6に示す。

又、メッセンジャーRNAからのリボソームの遊離も、アミドグリコシド類の代わりにGMP P C P又はフシジン酸を添加した点及びGMP P C Pを添加した場合にはGTP非存在下で実験を行った点を除いては例4と同じ方法にて調べた。GMP P C P又はフシジン酸は、それぞれ370 μ M、200 μ Mとなるように添加した。結果を表7に示す。

図6より、GMP P C P又はフシジン酸を添加しても、転移RNAの遊離はポジティブコントロールと同等の値であり、転移RNAの遊離が阻害され

ないことがわかる。一方、表7より、GMPPCP又はフシジン酸はリボソームの遊離を完全に阻害することがわかる (Igarashi, K., Ishitsuka, H. & Kaji, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 499-504 (1969); Hirashima, A. & Kaji, A. J. Mol. Biol. 65, 43-58 (1972); Ogawa, K. & Kaji, A. Eur. J. Biochem. 58, 411-419 (1975); Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H. & Ehrenberg, M. Molecular Cell 3, 601-609 (1999))。

これらの結果より、RRFは転移RNAと類似の挙動を示すことにより終結複合体解離活性を発現する可能性がより強く示唆され、さらに、転移RNAの遊離とリボソームの遊離が別個に阻害され得る事実は、終結複合体の解離が、EFGとRRFとによって段階的に進行するという図5に示すモデルを支持するものである。

例7. 過剰の脱アシル転移RNAの存在によるRRF活性の阻害

例4. により、RRFの活性の発現にはRRFがリボソームのA部位に結合することが必要であることが強く示唆された。従って、過剰の転移RNAが存在すれば、RRFと転移RNAとが競合してリボソームのA部位に結合するため、結果として終結複合体の解離が阻害されるはずである。この点を確認すべく、各種濃度の転移RNAの存在下における終結複合体の解離の阻害を調べた。

ポリソーム (0.5 ~ 1 A_{260} ユニット) を、0 ~ 1000 pmol eの間の各種の量のRRF、EFG、GTP及び0 ~ 10 nmol eの間の各種の量の転移RNAの存在下でインキュベートした。次いで、ショ糖密度勾配遠心 (密度勾配: 15 ~ 30%) を行った後、254 nmでの吸光度を測定することにより、遊離のリボソームの量を測定した。測定結果に基づいて作成したLineweaver-Burk プロットによるグラフを図7に示す。縦軸は、転移RNA非存在下における遊離のリボソーム量に対する、各種の量の転移RNA存在下における遊離のリボソーム量のパーセンテージの逆数である。

図7のグラフにおいて、転移RNAの量に関わらず縦軸切片は一定であり、かつ転移RNAの量の増大に伴い K_m が大きくなることから、転移RNAは

RRFの活性を競合的に阻害することがわかる。

【0091】

例8. パロモマイシンによるRRFのリボソームへの結合の阻害

例4. 及び例7の結果を踏まえ、例4. で用いたパロモマイシンがRRFのリボソームへの結合を阻害することを直接確認すべく、以下の実験を行った。

まず、1 pmole未満の ^{35}S 標識ヒスチジンタグRRF (^{35}S -His-RRF)を、10 pmoleの洗浄したリボソーム及び各種濃度のパロモマイシンの存在下で、緩衝液(トリス-Cl 50 mM、pH 7.6、酢酸マグネシウム 10 mM、塩化カリウム 30 mM、DTT 1 mM)中において30℃で10分間インキュベートした。微量濃縮により遊離の ^{35}S -His-RRFを除去した後、リボソーム結合 ^{35}S -His-RRFの量を放射活性により測定した。尚、 ^{35}S -His-RRFは、 ^{35}S 標識メチオニン存在下、in vitroで発現させたHis-RRFを、 Ni^{2+} ビーズを用いて精製することにより調製した。結果を図8に示す。RRFの結合率は、パロモマイシン非存在下においてリボソームに結合したRRFの量を100%として算出した値である。

図8より、RRFの結合率は、パロモマイシンの濃度に依存して減少することがわかる。従って、パロモマイシンは、RRFのリボソームへの結合を阻害することにより、RRFの活性を阻害すると考えられる。

表8

RRFの構造座標

	原子タイプ	残基	#	X	Y	Z	OCC	B
原子	1 CB	VAL	2	10.355	24.444	73.500	1.00	50.36
原子	2 CG1	VAL	2	11.185	25.300	72.669	1.00	50.36
原子	3 CG2	VAL	2	9.102	25.267	74.125	1.00	50.36
原子	4 C	VAL	2	8.502	23.777	72.304	1.00	83.11
原子	5 O	VAL	2	8.267	24.906	71.890	1.00	83.11
原子	6 N	VAL	2	10.415	23.206	71.242	1.00	83.11

原子	7	CA	VAL	2	9.881	23.282	72.625	1.00	83.11
原子	8	N	ASN	3	7.567	22.901	72.348	1.00	72.42
原子	9	CA	ASN	3	6.364	23.543	72.193	1.00	72.42
原子	10	CB	ASN	3	5.458	22.851	71.191	1.00	77.31
原子	11	CG	ASN	3	4.541	23.842	70.630	1.00	77.31
原子	12	OD1	ASN	3	3.368	23.859	70.934	1.00	77.31
原子	13	ND2	ASN	3	5.109	24.802	69.910	1.00	77.31
原子	14	C	ASN	3	6.085	23.280	73.622	1.00	72.42
原子	15	O	ASN	3	6.652	22.357	74.186	1.00	72.42
原子	16	N	PRO	4	5.407	24.244	74.267	1.00	41.97
原子	17	CD	PRO	4	4.846	25.501	73.729	1.00	61.56
原子	18	CA	PRO	4	5.121	24.010	75.681	1.00	41.97
原子	19	CB	PRO	4	3.981	24.999	75.973	1.00	61.56
原子	20	CG	PRO	4	3.931	25.973	74.808	1.00	61.56
原子	21	C	PRO	4	4.632	22.521	75.634	1.00	41.97
原子	22	O	PRO	4	4.781	21.774	76.617	1.00	41.97
原子	23	N	PHE	5	4.080	22.114	74.491	1.00	37.43
原子	24	CA	PHE	5	3.593	20.751	74.270	1.00	37.43
原子	25	CB	PHE	5	2.898	20.648	72.912	1.00	36.55
原子	26	CG	PHE	5	1.608	21.414	72.832	1.00	36.55
原子	27	CD1	PHE	5	1.285	22.160	71.693	1.00	36.55
原子	28	CD2	PHE	5	0.697	21.370	73.868	1.00	36.55
原子	29	CE1	PHE	5	0.081	22.866	71.612	1.00	36.55
原子	30	CE2	PHE	5	-0.505	22.072	73.792	1.00	36.55
原子	31	CZ	PHE	5	-0.815	22.815	72.652	1.00	36.55
原子	32	C	PHE	5	4.720	19.724	74.322	1.00	37.43
原子	33	O	PHE	5	4.603	18.687	74.974	1.00	37.43
原子	34	N	ILE	6	5.812	19.998	73.620	1.00	41.88
原子	35	CA	ILE	6	6.946	19.073	73.616	1.00	41.88

原子	36	CB	ILE	6	7.997	19.477	72.561	1.00	41.38
原子	37	CG2	ILE	6	9.276	18.658	72.740	1.00	41.38
原子	38	CG1	ILE	6	7.410	19.266	71.162	1.00	41.38
原子	39	CD1	ILE	6	8.209	19.943	70.059	1.00	41.38
原子	40	C	ILE	6	7.585	19.045	74.997	1.00	41.88
原子	41	O	ILE	6	7.926	17.982	75.516	1.00	41.88
原子	42	N	LYS	7	7.738	20.222	75.592	1.00	47.17
原子	43	CA	LYS	7	8.309	20.333	76.923	1.00	47.17
原子	44	CB	LYS	7	8.293	21.792	77.371	1.00	68.01
原子	45	CG	LYS	7	8.925	22.024	78.727	1.00	68.01
原子	46	CD	LYS	7	8.706	23.444	79.215	1.00	68.01
原子	47	CE	LYS	7	9.525	23.709	80.466	1.00	68.01
原子	48	NZ	LYS	7	8.752	24.480	81.480	1.00	68.01
原子	49	C	LYS	7	7.451	19.496	77.872	1.00	47.17
原子	50	O	LYS	7	7.963	18.740	78.701	1.00	47.17
原子	51	N	GLU	8	6.137	19.639	77.732	1.00	39.77
原子	52	CA	GLU	8	5.175	18.920	78.555	1.00	39.77
原子	53	CB	GLU	8	3.758	19.392	78.230	1.00	50.17
原子	54	CG	GLU	8	2.678	18.705	79.047	1.00	50.17
原子	55	CD	GLU	8	1.291	18.857	78.443	1.00	50.17
原子	56	OE1	GLU	8	0.319	18.370	79.058	1.00	50.17
原子	57	OE2	GLU	8	1.170	19.456	77.351	1.00	50.17
原子	58	C	GLU	8	5.269	17.406	78.349	1.00	39.77
原子	59	O	GLU	8	5.227	16.637	79.311	1.00	39.77
原子	60	N	ALA	9	5.385	16.979	77.095	1.00	39.35
原子	61	CA	ALA	9	5.487	15.558	76.790	1.00	39.35
原子	62	CB	ALA	9	5.452	15.336	75.294	1.00	32.04
原子	63	C	ALA	9	6.764	14.965	77.375	1.00	39.35
原子	64	O	ALA	9	6.751	13.859	77.905	1.00	39.35

原子	65	N	LYS	10	7.872	15.690	77.285	1.00	37.72
原子	66	CA	LYS	10	9.120	15.182	77.840	1.00	37.72
原子	67	CB	LYS	10	10.277	16.113	77.514	1.00	61.11
原子	68	CG	LYS	10	10.990	15.829	76.231	1.00	61.11
原子	69	CD	LYS	10	12.171	16.770	76.124	1.00	61.11
原子	70	CE	LYS	10	12.574	17.020	74.678	1.00	61.11
原子	71	NZ	LYS	10	13.323	18.307	74.569	1.00	61.11
原子	72	C	LYS	10	9.037	15.051	79.358	1.00	37.72
原子	73	O	LYS	10	9.508	14.073	79.939	1.00	37.72
原子	74	N	GLU	11	8.462	16.064	79.996	1.00	33.88
原子	75	CA	GLU	11	8.310	16.076	81.445	1.00	33.88
原子	76	CB	GLU	11	7.601	17.353	81.879	1.00	67.13
原子	77	CG	GLU	11	8.505	18.337	82.587	1.00	67.13
原子	78	CD	GLU	11	8.166	19.783	82.266	1.00	67.13
原子	79	OE1	GLU	11	6.969	20.147	82.296	1.00	67.13
原子	80	OE2	GLU	11	9.107	20.558	81.989	1.00	67.13
原子	81	C	GLU	11	7.529	14.860	81.929	1.00	33.88
原子	82	O	GLU	11	7.989	14.119	82.792	1.00	33.88
原子	83	N	LYS	12	6.349	14.648	81.365	1.00	39.27
原子	84	CA	LYS	12	5.528	13.518	81.766	1.00	39.27
原子	85	CB	LYS	12	4.137	13.637	81.143	1.00	39.81
原子	86	CG	LYS	12	3.424	14.898	81.559	1.00	39.81
原子	87	CD	LYS	12	2.028	14.985	80.996	1.00	39.81
原子	88	CE	LYS	12	1.299	16.195	81.576	1.00	39.81
原子	89	NZ	LYS	12	-0.138	16.215	81.177	1.00	39.81
原子	90	C	LYS	12	6.140	12.168	81.415	1.00	39.27
原子	91	O	LYS	12	6.132	11.245	82.230	1.00	39.27
原子	92	N	MET	13	6.680	12.054	80.206	1.00	33.90
原子	93	CA	MET	13	7.278	10.794	79.780	1.00	33.90

原子	94	CB	MET	13	7.651	10.852	78.307	1.00	28.84
原子	95	CG	MET	13	6.478	10.988	77.344	1.00	28.84
原子	96	SD	MET	13	6.965	10.623	75.666	1.00	28.84
原子	97	CE	MET	13	5.331	10.780	74.827	1.00	28.84
原子	98	C	MET	13	8.508	10.455	80.620	1.00	33.90
原子	99	O	MET	13	8.751	9.289	80.918	1.00	33.90
原子	100	N	LYS	14	9.266	11.468	81.007	1.00	36.32
原子	101	CA	LYS	14	10.454	11.270	81.829	1.00	36.32
原子	102	CB	LYS	14	11.207	12.592	81.957	1.00	65.45
原子	103	CG	LYS	14	12.582	12.500	82.550	1.00	65.45
原子	104	CD	LYS	14	12.746	13.568	83.609	1.00	65.45
原子	105	CE	LYS	14	14.212	13.894	83.838	1.00	65.45
原子	106	NZ	LYS	14	14.426	14.645	85.109	1.00	65.45
原子	107	C	LYS	14	10.008	10.798	83.206	1.00	36.32
原子	108	O	LYS	14	10.636	9.943	83.824	1.00	36.32
原子	109	N	ARG	15	8.911	11.358	83.681	1.00	38.00
原子	110	CA	ARG	15	8.416	10.992	84.979	1.00	38.00
原子	111	CB	ARG	15	7.311	11.927	85.390	1.00	88.37
原子	112	CG	ARG	15	7.456	12.225	86.815	1.00	88.37
原子	113	CD	ARG	15	6.197	11.885	87.496	1.00	88.37
原子	114	NE	ARG	15	5.468	13.131	87.703	1.00	88.37
原子	115	CZ	ARG	15	4.230	13.240	88.152	1.00	88.37
原子	116	NH1	ARG	15	3.586	12.163	88.540	1.00	88.37
原子	117	NH2	ARG	15	3.650	14.435	88.213	1.00	88.37
原子	118	C	ARG	15	7.932	9.557	85.018	1.00	38.00
原子	119	O	ARG	15	8.193	8.825	85.982	1.00	38.00
原子	120	N	THR	16	7.236	9.156	83.963	1.00	33.54
原子	121	CA	THR	16	6.738	7.794	83.844	1.00	33.54
原子	122	CB	THR	16	6.013	7.603	82.499	1.00	26.11

原子	123	OG1	THR	16	4.716	8.216	82.562	1.00	26.11
原子	124	CG2	THR	16	5.899	6.117	82.148	1.00	26.11
原子	125	C	THR	16	7.931	6.841	83.902	1.00	33.54
原子	126	O	THR	16	7.956	5.911	84.704	1.00	33.54
原子	127	N	LEU	17	8.932	7.102	83.067	1.00	33.14
原子	128	CA	LEU	17	10.119	6.269	83.019	1.00	33.14
原子	129	CB	LEU	17	11.101	6.824	81.990	1.00	34.14
原子	130	CG	LEU	17	12.339	5.962	81.742	1.00	34.14
原子	131	CD1	LEU	17	11.951	4.644	81.086	1.00	34.14
原子	132	CD2	LEU	17	13.301	6.728	80.857	1.00	34.14
原子	133	C	LEU	17	10.783	6.171	84.390	1.00	33.14
原子	134	O	LEU	17	11.261	5.107	84.779	1.00	33.14
原子	135	N	GLU	18	10.802	7.268	85.135	1.00	32.45
原子	136	CA	GLU	18	11.419	7.237	86.454	1.00	32.45
原子	137	CB	GLU	18	11.607	8.661	86.990	1.00	59.96
原子	138	CG	GLU	18	12.984	9.224	86.630	1.00	59.96
原子	139	CD	GLU	18	13.076	10.747	86.698	1.00	59.96
原子	140	OE1	GLU	18	12.049	11.401	86.979	1.00	59.96
原子	141	OE2	GLU	18	14.185	11.287	86.460	1.00	59.96
原子	142	C	GLU	18	10.617	6.370	87.427	1.00	32.45
原子	143	O	GLU	18	11.190	5.687	88.282	1.00	32.45
原子	144	N	LYS	19	9.295	6.370	87.279	1.00	28.05
原子	145	CA	LYS	19	8.453	5.563	88.149	1.00	28.05
原子	146	CB	LYS	19	6.976	5.900	87.953	1.00	77.52
原子	147	CG	LYS	19	6.557	7.201	88.607	1.00	77.52
原子	148	CD	LYS	19	5.099	7.151	89.044	1.00	77.52
原子	149	CE	LYS	19	4.700	8.412	89.804	1.00	77.52
原子	150	NZ	LYS	19	3.354	8.277	90.440	1.00	77.52
原子	151	C	LYS	19	8.673	4.085	87.883	1.00	28.05

原子	152	O	LYS	19	8.729	3.275	88.813	1.00	28.05
原子	153	N	ILE	20	8.797	3.732	86.608	1.00	37.89
原子	154	CA	ILE	20	9.015	2.343	86.236	1.00	37.89
原子	155	CB	ILE	20	9.029	2.170	84.707	1.00	33.33
原子	156	CG2	ILE	20	9.407	0.744	84.348	1.00	33.33
原子	157	CG1	ILE	20	7.665	2.572	84.131	1.00	33.33
原子	158	CD1	ILE	20	6.488	1.863	84.752	1.00	33.33
原子	159	C	ILE	20	10.339	1.851	86.799	1.00	37.89
原子	160	O	ILE	20	10.406	0.793	87.421	1.00	37.89
原子	161	N	GLU	21	11.392	2.628	86.583	1.00	35.03
原子	162	CA	GLU	21	12.708	2.250	87.075	1.00	35.03
原子	163	CB	GLU	21	13.729	3.337	86.732	1.00	30.62
原子	164	CG	GLU	21	13.803	3.617	85.237	1.00	30.62
原子	165	CD	GLU	21	14.648	4.828	84.908	1.00	30.62
原子	166	OE1	GLU	21	14.706	5.755	85.736	1.00	30.62
原子	167	OE2	GLU	21	15.239	4.866	83.815	1.00	30.62
原子	168	C	GLU	21	12.628	2.055	88.578	1.00	35.03
原子	169	O	GLU	21	13.327	1.228	89.154	1.00	35.03
原子	170	N	ASP	22	11.746	2.821	89.206	1.00	38.35
原子	171	CA	ASP	22	11.560	2.756	90.643	1.00	38.35
原子	172	CB	ASP	22	10.706	3.946	91.088	1.00	38.81
原子	173	CG	ASP	22	10.825	4.230	92.567	1.00	38.81
原子	174	OD1	ASP	22	11.961	4.281	93.066	1.00	38.81
原子	175	OD2	ASP	22	9.784	4.416	93.230	1.00	38.81
原子	176	C	ASP	22	10.888	1.427	90.999	1.00	38.35
原子	177	O	ASP	22	11.355	0.698	91.875	1.00	38.35
原子	178	N	GLU	23	9.804	1.104	90.302	1.00	29.14
原子	179	CA	GLU	23	9.094	-0.142	90.546	1.00	29.14
原子	180	CB	GLU	23	7.875	-0.235	89.633	1.00	47.44

原子	181	CG	GLU	23	6.846	0.839	89.933	1.00	47.44
原子	182	CD	GLU	23	5.624	0.775	89.039	1.00	47.44
原子	183	OE1	GLU	23	4.619	1.425	89.368	1.00	47.44
原子	184	OE2	GLU	23	5.654	0.085	88.005	1.00	47.44
原子	185	C	GLU	23	10.008	-1.349	90.338	1.00	29.14
原子	186	O	GLU	23	10.007	-2.283	91.142	1.00	29.14
原子	187	N	LEU	24	10.796	-1.327	89.266	1.00	38.04
原子	188	CA	LEU	24	11.716	-2.423	88.981	1.00	38.04
原子	189	CB	LEU	24	12.360	-2.229	87.614	1.00	26.06
原子	190	CG	LEU	24	11.366	-2.262	86.456	1.00	26.06
原子	191	CD1	LEU	24	12.097	-1.999	85.165	1.00	26.06
原子	192	CD2	LEU	24	10.657	-3.604	86.415	1.00	26.06
原子	193	C	LEU	24	12.805	-2.520	90.039	1.00	38.04
原子	194	O	LEU	24	13.360	-3.586	90.288	1.00	38.04
原子	195	N	ARG	25	13.097	-1.393	90.666	1.00	38.24
原子	196	CA	ARG	25	14.117	-1.324	91.690	1.00	38.24
原子	197	CB	ARG	25	14.552	0.128	91.846	1.00	32.35
原子	198	CG	ARG	25	15.401	0.400	93.059	1.00	32.35
原子	199	CD	ARG	25	15.612	1.890	93.266	1.00	32.35
原子	200	NE	ARG	25	15.485	2.205	94.680	1.00	32.35
原子	201	CZ	ARG	25	14.386	2.692	95.246	1.00	32.35
原子	202	NH1	ARG	25	13.310	2.945	94.516	1.00	32.35
原子	203	NH2	ARG	25	14.352	2.872	96.557	1.00	32.35
原子	204	C	ARG	25	13.648	-1.884	93.036	1.00	38.24
原子	205	O	ARG	25	14.452	-2.427	93.795	1.00	38.24
原子	206	N	LYS	26	12.352	-1.762	93.323	1.00	37.23
原子	207	CA	LYS	26	11.792	-2.239	94.590	1.00	37.23
原子	208	CB	LYS	26	10.685	-1.287	95.047	1.00	39.64
原子	209	CG	LYS	26	11.150	0.165	95.116	1.00	39.64

原子	210	CD	LYS	26	10.163	1.079	95.826	1.00	39.64
原子	211	CE	LYS	26	8.877	1.234	95.054	1.00	39.64
原子	212	NZ	LYS	26	8.005	2.257	95.699	1.00	39.64
原子	213	C	LYS	26	11.258	-3.672	94.522	1.00	37.23
原子	214	O	LYS	26	10.856	-4.257	95.529	1.00	37.23
原子	215	N	MET	27	11.270	-4.218	93.318	1.00	33.15
原子	216	CA	MET	27	10.814	-5.566	93.008	1.00	33.15
原子	217	CB	MET	27	11.078	-5.799	91.535	1.00	37.03
原子	218	CG	MET	27	9.999	-6.456	90.761	1.00	37.03
原子	219	SD	MET	27	10.710	-6.822	89.162	1.00	37.03
原子	220	CE	MET	27	10.529	-8.604	89.133	1.00	37.03
原子	221	C	MET	27	11.586	-6.625	93.797	1.00	33.15
原子	222	O	MET	27	12.817	-6.535	93.910	1.00	33.15
原子	223	N	ARG	28	10.891	-7.632	94.332	1.00	34.95
原子	224	CA	ARG	28	11.600	-8.700	95.047	1.00	34.95
原子	225	CB	ARG	28	10.653	-9.617	95.831	1.00	37.05
原子	226	CG	ARG	28	11.379	-10.784	96.563	1.00	37.05
原子	227	CD	ARG	28	11.935	-11.825	95.587	1.00	37.05
原子	228	NE	ARG	28	12.853	-12.803	96.172	1.00	37.05
原子	229	CZ	ARG	28	12.485	-13.830	96.935	1.00	37.05
原子	230	NH1	ARG	28	11.205	-14.023	97.227	1.00	37.05
原子	231	NH2	ARG	28	13.397	-14.685	97.381	1.00	37.05
原子	232	C	ARG	28	12.284	-9.524	93.976	1.00	34.95
原子	233	O	ARG	28	11.663	-9.932	92.999	1.00	34.95
原子	234	N	THR	29	13.560	-9.792	94.176	1.00	38.90
原子	235	CA	THR	29	14.324	-10.557	93.211	1.00	38.90
原子	236	CB	THR	29	15.137	-9.563	92.332	1.00	35.61
原子	237	OG1	THR	29	14.492	-9.442	91.059	1.00	35.61
原子	238	CG2	THR	29	16.569	-9.974	92.161	1.00	35.61

原子	239	C	THR	29	15.184	-11.578	93.952	1.00	38.90
原子	240	O	THR	29	15.051	-11.739	95.164	1.00	38.90
原子	241	N	GLY	30	16.041	-12.288	93.233	1.00	39.05
原子	242	CA	GLY	30	16.877	-13.287	93.870	1.00	39.05
原子	243	C	GLY	30	17.824	-12.818	94.961	1.00	39.05
原子	244	O	GLY	30	18.097	-13.571	95.894	1.00	39.05
原子	245	N	LYS	31	18.327	-11.591	94.864	1.00	44.38
原子	246	CA	LYS	31	19.276	-11.095	95.859	1.00	44.38
原子	247	CB	LYS	31	20.463	-10.413	95.166	1.00	96.17
原子	248	CG	LYS	31	20.425	-8.883	95.169	1.00	96.17
原子	249	CD	LYS	31	19.350	-8.309	94.249	1.00	96.17
原子	250	CE	LYS	31	19.212	-6.796	94.447	1.00	96.17
原子	251	NZ	LYS	31	20.346	-6.211	95.237	1.00	96.17
原子	252	C	LYS	31	18.665	-10.138	96.876	1.00	44.38
原子	253	O	LYS	31	17.769	-9.360	96.553	1.00	44.38
原子	254	N	PRO	32	19.162	-10.176	98.121	1.00	38.22
原子	255	CD	PRO	32	20.333	-10.942	98.583	1.00	38.30
原子	256	CA	PRO	32	18.663	-9.308	99.190	1.00	38.22
原子	257	CB	PRO	32	19.512	-9.720	100.391	1.00	38.30
原子	258	CG	PRO	32	20.805	-10.115	99.765	1.00	38.30
原子	259	C	PRO	32	18.823	-7.833	98.853	1.00	38.22
原子	260	O	PRO	32	19.905	-7.386	98.482	1.00	38.22
原子	261	N	SER	33	17.734	-7.082	98.981	1.00	37.83
原子	262	CA	SER	33	17.753	-5.655	98.705	1.00	37.83
原子	263	CB	SER	33	17.385	-5.392	97.245	1.00	42.16
原子	264	OG	SER	33	17.475	-4.009	96.959	1.00	42.16
原子	265	C	SER	33	16.785	-4.914	99.626	1.00	37.83
原子	266	O	SER	33	15.588	-5.189	99.634	1.00	37.83
原子	267	N	PRO	34	17.302	-3.967	100.425	1.00	31.79

原子	268	CD	PRO	34	18.736	-3.767	100.705	1.00	21.38
原子	269	CA	PRO	34	16.450	-3.202	101.343	1.00	31.79
原子	270	CB	PRO	34	17.413	-2.226	102.022	1.00	21.38
原子	271	CG	PRO	34	18.762	-2.426	101.353	1.00	21.38
原子	272	C	PRO	34	15.304	-2.485	100.653	1.00	31.79
原子	273	O	PRO	34	14.306	-2.134	101.285	1.00	31.79
原子	274	N	ALA	35	15.435	-2.301	99.346	1.00	38.20
原子	275	CA	ALA	35	14.432	-1.607	98.561	1.00	38.20
原子	276	CB	ALA	35	14.956	-1.386	97.157	1.00	17.23
原子	277	C	ALA	35	13.072	-2.287	98.506	1.00	38.20
原子	278	O	ALA	35	12.067	-1.630	98.221	1.00	38.20
原子	279	N	ILE	36	13.024	-3.593	98.765	1.00	43.48
原子	280	CA	ILE	36	11.751	-4.315	98.723	1.00	43.48
原子	281	CB	ILE	36	11.950	-5.840	98.563	1.00	35.86
原子	282	CG2	ILE	36	12.611	-6.150	97.237	1.00	35.86
原子	283	CG1	ILE	36	12.815	-6.383	99.691	1.00	35.86
原子	284	CD1	ILE	36	13.127	-7.851	99.539	1.00	35.86
原子	285	C	ILE	36	10.902	-4.072	99.962	1.00	43.48
原子	286	O	ILE	36	9.721	-4.402	99.979	1.00	43.48
原子	287	N	LEU	37	11.502	-3.493	100.995	1.00	45.44
原子	288	CA	LEU	37	10.775	-3.214	102.222	1.00	45.44
原子	289	CB	LEU	37	11.697	-3.364	103.431	1.00	37.85
原子	290	CG	LEU	37	12.257	-4.779	103.613	1.00	37.85
原子	291	CD1	LEU	37	13.166	-4.833	104.832	1.00	37.85
原子	292	CD2	LEU	37	11.108	-5.760	103.761	1.00	37.85
原子	293	C	LEU	37	10.169	-1.822	102.205	1.00	45.44
原子	294	O	LEU	37	9.378	-1.474	103.075	1.00	45.44
原子	295	N	GLU	38	10.533	-1.029	101.206	1.00	35.29
原子	296	CA	GLU	38	10.024	0.327	101.086	1.00	35.29

原子	297	CB	GLU	38	10.727	1.047	99.938	1.00	35.02
原子	298	CG	GLU	38	12.126	1.507	100.291	1.00	35.02
原子	299	CD	GLU	38	12.859	2.111	99.118	1.00	35.02
原子	300	OE1	GLU	38	12.198	2.705	98.240	1.00	35.02
原子	301	OE2	GLU	38	14.103	2.005	99.084	1.00	35.02
原子	302	C	GLU	38	8.525	0.376	100.881	1.00	35.29
原子	303	O	GLU	38	7.898	1.409	101.088	1.00	35.29
原子	304	N	GLU	39	7.940	-0.744	100.485	1.00	43.94
原子	305	CA	GLU	39	6.503	-0.787	100.259	1.00	43.94
原子	306	CB	GLU	39	6.211	-1.291	98.846	1.00	81.69
原子	307	CG	GLU	39	6.456	-0.239	97.771	1.00	81.69
原子	308	CD	GLU	39	5.420	0.872	97.802	1.00	81.69
原子	309	OE1	GLU	39	4.242	0.586	97.505	1.00	81.69
原子	310	OE2	GLU	39	5.777	2.027	98.125	1.00	81.69
原子	311	C	GLU	39	5.783	-1.642	101.289	1.00	43.94
原子	312	O	GLU	39	4.582	-1.860	101.187	1.00	43.94
原子	313	N	ILE	40	6.519	-2.130	102.279	1.00	39.98
原子	314	CA	ILE	40	5.914	-2.929	103.332	1.00	39.98
原子	315	CB	ILE	40	6.874	-4.032	103.844	1.00	36.67
原子	316	CG2	ILE	40	6.193	-4.855	104.920	1.00	36.67
原子	317	CG1	ILE	40	7.284	-4.952	102.694	1.00	36.67
原子	318	CD1	ILE	40	6.116	-5.618	102.010	1.00	36.67
原子	319	C	ILE	40	5.591	-1.969	104.478	1.00	39.98
原子	320	O	ILE	40	6.490	-1.467	105.153	1.00	39.98
原子	321	N	LYS	41	4.305	-1.705	104.682	1.00	42.16
原子	322	CA	LYS	41	3.877	-0.797	105.732	1.00	42.16
原子	323	CB	LYS	41	2.794	0.146	105.205	1.00	51.75
原子	324	CG	LYS	41	3.189	0.926	103.966	1.00	51.75
原子	325	CD	LYS	41	1.962	1.566	103.350	1.00	51.75

原子	326	CE	LYS	41	2.274	2.250	102.032	1.00	51.75
原子	327	NZ	LYS	41	3.149	3.440	102.204	1.00	51.75
原子	328	C	LYS	41	3.346	-1.535	106.954	1.00	42.16
原子	329	O	LYS	41	2.775	-2.625	106.861	1.00	42.16
原子	330	N	VAL	42	3.527	-0.902	108.104	1.00	36.81
原子	331	CA	VAL	42	3.099	-1.440	109.377	1.00	36.81
原子	332	CB	VAL	42	4.351	-1.856	110.199	1.00	34.57
原子	333	CG1	VAL	42	4.204	-1.477	111.654	1.00	34.57
原子	334	CG2	VAL	42	4.578	-3.349	110.051	1.00	34.57
原子	335	C	VAL	42	2.313	-0.330	110.067	1.00	36.81
原子	336	O	VAL	42	2.684	0.836	109.975	1.00	36.81
原子	337	N	ASP	43	1.218	-0.676	110.734	1.00	42.28
原子	338	CA	ASP	43	0.416	0.329	111.424	1.00	42.28
原子	339	CB	ASP	43	-1.006	-0.189	111.671	1.00	62.32
原子	340	CG	ASP	43	-1.902	0.849	112.335	1.00	62.32
原子	341	OD1	ASP	43	-2.036	1.970	111.797	1.00	62.32
原子	342	OD2	ASP	43	-2.484	0.547	113.398	1.00	62.32
原子	343	C	ASP	43	1.099	0.650	112.743	1.00	42.28
原子	344	O	ASP	43	0.885	-0.027	113.744	1.00	42.28
原子	345	N	TYR	44	1.927	1.686	112.729	1.00	35.94
原子	346	CA	TYR	44	2.673	2.111	113.908	1.00	35.94
原子	347	CB	TYR	44	4.131	2.369	113.524	1.00	28.29
原子	348	CG	TYR	44	5.058	2.554	114.707	1.00	28.29
原子	349	CD1	TYR	44	5.766	3.746	114.883	1.00	28.29
原子	350	CE1	TYR	44	6.611	3.920	115.961	1.00	28.29
原子	351	CD2	TYR	44	5.230	1.533	115.650	1.00	28.29
原子	352	CE2	TYR	44	6.081	1.699	116.738	1.00	28.29
原子	353	CZ	TYR	44	6.769	2.893	116.881	1.00	28.29
原子	354	OH	TYR	44	7.623	3.064	117.938	1.00	28.29

原子	355	C	TYR	44	2.069	3.372	114.511	1.00	35.94
原子	356	O	TYR	44	2.100	4.439	113.898	1.00	35.94
原子	357	N	TYR	45	1.528	3.240	115.718	1.00	38.53
原子	358	CA	TYR	45	0.889	4.347	116.424	1.00	38.53
原子	359	CB	TYR	45	1.935	5.289	117.025	1.00	41.05
原子	360	CG	TYR	45	2.617	4.715	118.244	1.00	41.05
原子	361	CD1	TYR	45	3.728	3.879	118.120	1.00	41.05
原子	362	CE1	TYR	45	4.337	3.317	119.241	1.00	41.05
原子	363	CD2	TYR	45	2.144	4.998	119.532	1.00	41.05
原子	364	CE2	TYR	45	2.745	4.438	120.662	1.00	41.05
原子	365	CZ	TYR	45	3.851	3.610	120.506	1.00	41.05
原子	366	OH	TYR	45	4.461	3.056	121.610	1.00	41.05
原子	367	C	TYR	45	-0.086	5.148	115.573	1.00	38.53
原子	368	O	TYR	45	0.015	6.370	115.489	1.00	38.53
原子	369	N	GLY	46	-1.028	4.449	114.945	1.00	42.43
原子	370	CA	GLY	46	-2.034	5.107	114.128	1.00	42.43
原子	371	C	GLY	46	-1.673	5.501	112.705	1.00	42.43
原子	372	O	GLY	46	-2.542	5.949	111.957	1.00	42.43
原子	373	N	VAL	47	-0.416	5.327	112.313	1.00	41.54
原子	374	CA	VAL	47	0.010	5.700	110.969	1.00	41.54
原子	375	CB	VAL	47	0.992	6.898	111.037	1.00	35.99
原子	376	CG1	VAL	47	1.674	7.109	109.689	1.00	35.99
原子	377	CG2	VAL	47	0.237	8.148	111.451	1.00	35.99
原子	378	C	VAL	47	0.663	4.580	110.155	1.00	41.54
原子	379	O	VAL	47	1.623	3.958	110.604	1.00	41.54
原子	380	N	PRO	48	0.146	4.309	108.943	1.00	40.25
原子	381	CD	PRO	48	-1.000	4.969	108.294	1.00	34.00
原子	382	CA	PRO	48	0.709	3.259	108.080	1.00	40.25
原子	383	CB	PRO	48	-0.119	3.372	106.804	1.00	34.00

原子	384	CG	PRO	48	-1.437	3.928	107.293	1.00	34.00
原子	385	C	PRO	48	2.156	3.665	107.849	1.00	40.25
原子	386	O	PRO	48	2.420	4.700	107.237	1.00	40.25
原子	387	N	THR	49	3.096	2.855	108.316	1.00	32.23
原子	388	CA	THR	49	4.495	3.232	108.207	1.00	32.23
原子	389	CB	THR	49	5.047	3.475	109.622	1.00	26.24
原子	390	OG1	THR	49	4.090	4.237	110.368	1.00	26.24
原子	391	CG2	THR	49	6.375	4.212	109.574	1.00	26.24
原子	392	C	THR	49	5.434	2.271	107.485	1.00	32.23
原子	393	O	THR	49	5.561	1.108	107.867	1.00	32.23
原子	394	N	PRO	50	6.086	2.742	106.407	1.00	39.12
原子	395	CD	PRO	50	5.650	3.818	105.506	1.00	28.33
原子	396	CA	PRO	50	6.999	1.833	105.718	1.00	39.12
原子	397	CB	PRO	50	7.593	2.691	104.595	1.00	28.33
原子	398	CG	PRO	50	6.843	3.998	104.624	1.00	28.33
原子	399	C	PRO	50	8.045	1.349	106.709	1.00	39.12
原子	400	O	PRO	50	8.515	2.111	107.545	1.00	39.12
原子	401	N	VAL	51	8.404	0.076	106.603	1.00	34.69
原子	402	CA	VAL	51	9.356	-0.539	107.511	1.00	34.69
原子	403	CB	VAL	51	9.576	-2.006	107.122	1.00	36.79
原子	404	CG1	VAL	51	10.622	-2.623	108.005	1.00	36.79
原子	405	CG2	VAL	51	8.264	-2.773	107.254	1.00	36.79
原子	406	C	VAL	51	10.714	0.138	107.685	1.00	34.69
原子	407	O	VAL	51	11.158	0.336	108.817	1.00	34.69
原子	408	N	ASN	52	11.375	0.493	106.585	1.00	43.32
原子	409	CA	ASN	52	12.694	1.124	106.670	1.00	43.32
原子	410	CB	ASN	52	13.256	1.391	105.274	1.00	45.16
原子	411	CG	ASN	52	12.336	2.247	104.434	1.00	45.16
原子	412	OD1	ASN	52	11.261	1.808	104.033	1.00	45.16

原子	413	ND2	ASN	52	12.747	3.475	104.172	1.00	45.16
原子	414	C	ASN	52	12.698	2.423	107.458	1.00	43.32
原子	415	O	ASN	52	13.754	3.003	107.684	1.00	43.32
原子	416	N	GLN	53	11.522	2.883	107.868	1.00	41.50
原子	417	CA	GLN	53	11.415	4.120	108.635	1.00	41.50
原子	418	CB	GLN	53	10.109	4.841	108.305	1.00	32.22
原子	419	CG	GLN	53	10.163	5.659	107.035	1.00	32.22
原子	420	CD	GLN	53	8.818	6.244	106.664	1.00	32.22
原子	421	OE1	GLN	53	8.030	6.641	107.531	1.00	32.22
原子	422	NE2	GLN	53	8.551	6.320	105.363	1.00	32.22
原子	423	C	GLN	53	11.465	3.823	110.118	1.00	41.50
原子	424	O	GLN	53	11.719	4.713	110.937	1.00	41.50
原子	425	N	LEU	54	11.230	2.559	110.454	1.00	35.24
原子	426	CA	LEU	54	11.230	2.113	111.842	1.00	35.24
原子	427	CB	LEU	54	9.949	1.328	112.132	1.00	27.96
原子	428	CG	LEU	54	8.637	2.050	111.839	1.00	27.96
原子	429	CD1	LEU	54	7.462	1.130	112.101	1.00	27.96
原子	430	CD2	LEU	54	8.555	3.294	112.702	1.00	27.96
原子	431	C	LEU	54	12.427	1.223	112.144	1.00	35.24
原子	432	O	LEU	54	12.525	0.660	113.238	1.00	35.24
原子	433	N	ALA	55	13.341	1.091	111.188	1.00	26.03
原子	434	CA	ALA	55	14.481	0.218	111.411	1.00	26.03
原子	435	CB	ALA	55	14.038	-1.244	111.294	1.00	26.69
原子	436	C	ALA	55	15.638	0.457	110.479	1.00	26.03
原子	437	O	ALA	55	15.495	1.068	109.422	1.00	26.03
原子	438	N	THR	56	16.798	-0.025	110.897	1.00	37.20
原子	439	CA	THR	56	17.994	0.075	110.087	1.00	37.20
原子	440	CB	THR	56	19.261	0.167	110.946	1.00	41.17
原子	441	OG1	THR	56	19.399	-1.027	111.726	1.00	41.17

原子	442	CG2	THR	56	19.177	1.357	111.879	1.00	41.17
原子	443	C	THR	56	18.009	-1.238	109.317	1.00	37.20
原子	444	O	THR	56	17.785	-2.313	109.890	1.00	37.20
原子	445	N	ILE	57	18.244	-1.160	108.017	1.00	53.27
原子	446	CA	ILE	57	18.268	-2.364	107.214	1.00	53.27
原子	447	CB	ILE	57	17.193	-2.321	106.131	1.00	37.44
原子	448	CG2	ILE	57	17.215	-3.612	105.330	1.00	37.44
原子	449	CG1	ILE	57	15.828	-2.101	106.789	1.00	37.44
原子	450	CD1	ILE	57	14.665	-2.037	105.810	1.00	37.44
原子	451	C	ILE	57	19.632	-2.521	106.579	1.00	53.27
原子	452	O	ILE	57	20.124	-1.626	105.899	1.00	53.27
原子	453	N	SER	58	20.248	-3.668	106.820	1.00	58.33
原子	454	CA	SER	58	21.571	-3.954	106.287	1.00	58.33
原子	455	CB	SER	58	22.609	-3.776	107.395	1.00	54.61
原子	456	OG	SER	58	22.130	-4.320	108.610	1.00	54.61
原子	457	C	SER	58	21.619	-5.371	105.735	1.00	58.33
原子	458	O	SER	58	20.691	-6.142	105.952	1.00	58.33
原子	459	N	ILE	59	22.696	-5.719	105.047	1.00	52.33
原子	460	CA	ILE	59	22.809	-7.036	104.463	1.00	52.33
原子	461	CB	ILE	59	23.345	-6.880	103.002	1.00	41.35
原子	462	CG2	ILE	59	23.395	-8.205	102.308	1.00	41.35
原子	463	CG1	ILE	59	22.416	-5.923	102.242	1.00	41.35
原子	464	CD1	ILE	59	22.248	-6.171	100.721	1.00	41.35
原子	465	C	ILE	59	23.718	-7.878	105.353	1.00	52.33
原子	466	O	ILE	59	24.936	-7.696	105.361	1.00	52.33
原子	467	N	SER	60	23.109	-8.762	106.143	1.00	60.00
原子	468	CA	SER	60	23.886	-9.591	107.064	1.00	60.00
原子	469	CB	SER	60	23.010	-10.539	107.912	1.00	60.63
原子	470	OG	SER	60	22.600	-11.739	107.279	1.00	60.63

原子	471	C	SER	60	24.778	-10.428	106.252	1.00	60.00
原子	472	O	SER	60	25.950	-10.189	106.125	1.00	60.00
原子	473	N	GLU	61	24.235	-11.488	105.732	1.00	87.30
原子	474	CA	GLU	61	25.102	-12.210	104.852	1.00	87.30
原子	475	CB	GLU	61	25.179	-13.704	105.187	1.00	88.30
原子	476	CG	GLU	61	23.932	-14.400	105.050	1.00	88.30
原子	477	CD	GLU	61	24.112	-15.569	104.196	1.00	88.30
原子	478	OE1	GLU	61	23.382	-15.647	103.202	1.00	88.30
原子	479	OE2	GLU	61	24.982	-16.404	104.514	1.00	88.30
原子	480	C	GLU	61	24.601	-11.951	103.471	1.00	87.30
原子	481	O	GLU	61	23.600	-11.303	103.276	1.00	87.30
原子	482	N	GLU	62	25.450	-12.404	102.552	1.00	61.89
原子	483	CA	GLU	62	25.257	-12.362	101.100	1.00	61.89
原子	484	CB	GLU	62	26.426	-13.116	100.473	1.00	60.63
原子	485	CG	GLU	62	27.704	-12.340	100.884	1.00	60.63
原子	486	CD	GLU	62	28.278	-12.647	102.306	1.00	60.63
原子	487	OE1	GLU	62	27.634	-13.284	103.188	1.00	60.63
原子	488	OE2	GLU	62	29.433	-12.215	102.521	1.00	60.63
原子	489	C	GLU	62	23.847	-12.744	100.622	1.00	61.89
原子	490	O	GLU	62	23.455	-12.418	99.550	1.00	61.89
原子	491	N	ARG	63	23.074	-13.357	101.491	1.00	43.14
原子	492	CA	ARG	63	21.691	-13.788	101.154	1.00	43.14
原子	493	CB	ARG	63	21.592	-15.314	101.038	1.00	76.81
原子	494	CG	ARG	63	22.506	-15.940	100.016	1.00	76.81
原子	495	CD	ARG	63	21.645	-16.662	99.020	1.00	76.81
原子	496	NE	ARG	63	22.409	-17.245	97.930	1.00	76.81
原子	497	CZ	ARG	63	21.892	-17.540	96.743	1.00	76.81
原子	498	NH1	ARG	63	20.610	-17.305	96.498	1.00	76.81
原子	499	NH2	ARG	63	22.663	-18.049	95.793	1.00	76.81

原子	500	C	ARG	63	20.705	-13.359	102.198	1.00	43.14
原子	501	O	ARG	63	19.544	-13.764	102.165	1.00	43.14
原子	502	N	THR	64	21.161	-12.500	103.109	1.00	37.34
原子	503	CA	THR	64	20.310	-12.052	104.183	1.00	37.34
原子	504	CB	THR	64	20.799	-12.615	105.553	1.00	39.55
原子	505	OG1	THR	64	20.904	-14.040	105.505	1.00	39.55
原子	506	CG2	THR	64	19.819	-12.237	106.662	1.00	39.55
原子	507	C	THR	64	20.118	-10.553	104.378	1.00	37.34
原子	508	O	THR	64	21.053	-9.760	104.271	1.00	37.34
原子	509	N	LEU	65	18.880	-10.188	104.695	1.00	39.85
原子	510	CA	LEU	65	18.516	-8.812	104.998	1.00	39.85
原子	511	CB	LEU	65	17.236	-8.403	104.271	1.00	33.79
原子	512	CG	LEU	65	17.295	-7.751	102.896	1.00	33.79
原子	513	CD1	LEU	65	15.874	-7.601	102.368	1.00	33.79
原子	514	CD2	LEU	65	17.989	-6.408	102.997	1.00	33.79
原子	515	C	LEU	65	18.225	-8.806	106.489	1.00	39.85
原子	516	O	LEU	65	17.402	-9.585	106.956	1.00	39.85
原子	517	N	VAL	66	18.902	-7.950	107.238	1.00	42.65
原子	518	CA	VAL	66	18.649	-7.864	108.666	1.00	42.65
原子	519	CB	VAL	66	19.958	-7.878	109.478	1.00	46.94
原子	520	CG1	VAL	66	19.654	-7.792	110.951	1.00	46.94
原子	521	CG2	VAL	66	20.718	-9.152	109.203	1.00	46.94
原子	522	C	VAL	66	17.904	-6.558	108.909	1.00	42.65
原子	523	O	VAL	66	18.366	-5.487	108.514	1.00	42.65
原子	524	N	ILE	67	16.740	-6.669	109.543	1.00	31.17
原子	525	CA	ILE	67	15.890	-5.526	109.844	1.00	31.17
原子	526	CB	ILE	67	14.441	-5.790	109.421	1.00	22.89
原子	527	CG2	ILE	67	13.618	-4.516	109.546	1.00	22.89
原子	528	CG1	ILE	67	14.401	-6.336	107.987	1.00	22.89

原子	529	CD1	ILE	67	13.024	-6.819	107.571	1.00	22.89
原子	530	C	ILE	67	15.888	-5.308	111.345	1.00	31.17
原子	531	O	ILE	67	15.204	-6.032	112.073	1.00	31.17
原子	532	N	LYS	68	16.639	-4.309	111.806	1.00	42.20
原子	533	CA	LYS	68	16.719	-4.005	113.229	1.00	42.20
原子	534	CB	LYS	68	18.180	-3.819	113.623	1.00	56.36
原子	535	CG	LYS	68	18.405	-3.640	115.105	1.00	56.36
原子	536	CD	LYS	68	19.850	-3.923	115.458	1.00	56.36
原子	537	CE	LYS	68	20.079	-3.792	116.952	1.00	56.36
原子	538	NZ	LYS	68	19.129	-4.626	117.749	1.00	56.36
原子	539	C	LYS	68	15.913	-2.768	113.634	1.00	42.20
原子	540	O	LYS	68	16.306	-1.636	113.360	1.00	42.20
原子	541	N	PRO	69	14.763	-2.970	114.283	1.00	39.13
原子	542	CD	PRO	69	14.029	-4.240	114.428	1.00	36.24
原子	543	CA	PRO	69	13.936	-1.837	114.709	1.00	39.13
原子	544	CB	PRO	69	12.530	-2.410	114.649	1.00	36.24
原子	545	CG	PRO	69	12.750	-3.805	115.143	1.00	36.24
原子	546	C	PRO	69	14.320	-1.409	116.123	1.00	39.13
原子	547	O	PRO	69	14.665	-2.247	116.950	1.00	39.13
原子	548	N	TRP	70	14.274	-0.112	116.406	1.00	35.31
原子	549	CA	TRP	70	14.625	0.359	117.742	1.00	35.31
原子	550	CB	TRP	70	14.990	1.843	117.719	1.00	54.18
原子	551	CG	TRP	70	14.618	2.524	116.449	1.00	54.18
原子	552	CD2	TRP	70	13.375	3.187	116.177	1.00	54.18
原子	553	CE2	TRP	70	13.461	3.663	114.844	1.00	54.18
原子	554	CE3	TRP	70	12.220	3.423	116.922	1.00	54.18
原子	555	CD1	TRP	70	15.371	2.620	115.312	1.00	54.18
原子	556	NE1	TRP	70	14.671	3.305	114.345	1.00	54.18
原子	557	CZ2	TRP	70	12.400	4.366	114.251	1.00	54.18

原子	558	CZ3	TRP	70	11.174	4.121	116.329	1.00	54.18
原子	559	CH2	TRP	70	11.276	4.587	115.003	1.00	54.18
原子	560	C	TRP	70	13.477	0.111	118.713	1.00	35.31
原子	561	O	TRP	70	13.690	0.011	119.913	1.00	35.31
原子	562	N	ASP	71	12.259	0.018	118.194	1.00	38.62
原子	563	CA	ASP	71	11.097	-0.252	119.036	1.00	38.62
原子	564	CB	ASP	71	9.897	0.580	118.587	1.00	33.95
原子	565	CG	ASP	71	8.667	0.323	119.436	1.00	33.95
原子	566	OD1	ASP	71	8.604	-0.741	120.086	1.00	33.95
原子	567	OD2	ASP	71	7.754	1.174	119.445	1.00	33.95
原子	568	C	ASP	71	10.785	-1.740	118.869	1.00	38.62
原子	569	O	ASP	71	10.037	-2.142	117.972	1.00	38.62
原子	570	N	LYS	72	11.361	-2.553	119.741	1.00	42.47
原子	571	CA	LYS	72	11.190	-3.990	119.661	1.00	42.47
原子	572	CB	LYS	72	11.903	-4.650	120.843	1.00	41.13
原子	573	CG	LYS	72	13.420	-4.457	120.777	1.00	41.13
原子	574	CD	LYS	72	13.964	-5.079	119.500	1.00	41.13
原子	575	CE	LYS	72	15.041	-4.235	118.810	1.00	41.13
原子	576	NZ	LYS	72	16.328	-4.168	119.527	1.00	41.13
原子	577	C	LYS	72	9.774	-4.530	119.516	1.00	42.47
原子	578	O	LYS	72	9.600	-5.690	119.148	1.00	42.47
原子	579	N	SER	73	8.759	-3.719	119.781	1.00	36.48
原子	580	CA	SER	73	7.390	-4.212	119.631	1.00	36.48
原子	581	CB	SER	73	6.401	-3.336	120.403	1.00	49.51
原子	582	OG	SER	73	6.288	-2.045	119.832	1.00	49.51
原子	583	C	SER	73	7.030	-4.206	118.153	1.00	36.48
原子	584	O	SER	73	6.006	-4.745	117.750	1.00	36.48
原子	585	N	VAL	74	7.891	-3.593	117.352	1.00	41.78
原子	586	CA	VAL	74	7.690	-3.487	115.910	1.00	41.78

原子	587	CB	VAL	74	8.562	-2.340	115.332	1.00	35.01
原子	588	CG1	VAL	74	8.640	-2.425	113.811	1.00	35.01
原子	589	CG2	VAL	74	7.982	-1.009	115.754	1.00	35.01
原子	590	C	VAL	74	7.997	-4.791	115.176	1.00	41.78
原子	591	O	VAL	74	7.475	-5.032	114.085	1.00	41.78
原子	592	N	LEU	75	8.842	-5.626	115.778	1.00	35.55
原子	593	CA	LEU	75	9.212	-6.914	115.191	1.00	35.55
原子	594	CB	LEU	75	10.063	-7.707	116.180	1.00	30.58
原子	595	CG	LEU	75	11.420	-7.091	116.509	1.00	30.58
原子	596	CD1	LEU	75	12.024	-7.786	117.707	1.00	30.58
原子	597	CD2	LEU	75	12.338	-7.213	115.288	1.00	30.58
原子	598	C	LEU	75	7.968	-7.725	114.828	1.00	35.55
原子	599	O	LEU	75	7.830	-8.220	113.714	1.00	35.55
原子	600	N	SER	76	7.057	-7.850	115.777	1.00	35.44
原子	601	CA	SER	76	5.843	-8.601	115.540	1.00	35.44
原子	602	CB	SER	76	4.954	-8.545	116.782	1.00	41.93
原子	603	OG	SER	76	3.829	-9.382	116.623	1.00	41.93
原子	604	C	SER	76	5.087	-8.062	114.321	1.00	35.44
原子	605	O	SER	76	4.649	-8.831	113.462	1.00	35.44
原子	606	N	LEU	77	4.951	-6.738	114.251	1.00	39.58
原子	607	CA	LEU	77	4.246	-6.078	113.152	1.00	39.58
原子	608	CB	LEU	77	4.097	-4.577	113.446	1.00	32.60
原子	609	CG	LEU	77	3.248	-4.216	114.681	1.00	32.60
原子	610	CD1	LEU	77	3.301	-2.715	114.936	1.00	32.60
原子	611	CD2	LEU	77	1.808	-4.676	114.476	1.00	32.60
原子	612	C	LEU	77	4.941	-6.277	111.805	1.00	39.58
原子	613	O	LEU	77	4.288	-6.510	110.787	1.00	39.58
原子	614	N	ILE	78	6.263	-6.181	111.792	1.00	38.16
原子	615	CA	ILE	78	6.996	-6.362	110.553	1.00	38.16

原子	616	CB	ILE	78	8.501	-6.146	110.753	1.00	31.39
原子	617	CG2	ILE	78	9.240	-6.525	109.478	1.00	31.39
原子	618	CG1	ILE	78	8.773	-4.691	111.153	1.00	31.39
原子	619	CD1	ILE	78	10.212	-4.413	111.518	1.00	31.39
原子	620	C	ILE	78	6.779	-7.774	110.031	1.00	38.16
原子	621	O	ILE	78	6.590	-7.985	108.833	1.00	38.16
原子	622	N	GLU	79	6.802	-8.737	110.942	1.00	34.51
原子	623	CA	GLU	79	6.618	-10.136	110.599	1.00	34.51
原子	624	CB	GLU	79	6.802	-10.982	111.857	1.00	43.51
原子	625	CG	GLU	79	6.587	-12.471	111.665	1.00	43.51
原子	626	CD	GLU	79	6.869	-13.261	112.931	1.00	43.51
原子	627	OE1	GLU	79	6.782	-14.505	112.889	1.00	43.51
原子	628	OE2	GLU	79	7.178	-12.642	113.972	1.00	43.51
原子	629	C	GLU	79	5.243	-10.387	109.987	1.00	34.51
原子	630	O	GLU	79	5.115	-11.058	108.961	1.00	34.51
原子	631	N	LYS	80	4.215	-9.846	110.625	1.00	41.03
原子	632	CA	LYS	80	2.845	-9.994	110.153	1.00	41.03
原子	633	CB	LYS	80	1.905	-9.247	111.090	1.00	63.82
原子	634	CG	LYS	80	0.758	-10.055	111.630	1.00	63.82
原子	635	CD	LYS	80	1.056	-10.548	113.035	1.00	63.82
原子	636	CE	LYS	80	-0.230	-10.873	113.785	1.00	63.82
原子	637	NZ	LYS	80	0.064	-11.206	115.204	1.00	63.82
原子	638	C	LYS	80	2.695	-9.401	108.753	1.00	41.03
原子	639	O	LYS	80	2.128	-10.022	107.847	1.00	41.03
原子	640	N	ALA	81	3.198	-8.177	108.601	1.00	39.91
原子	641	CA	ALA	81	3.131	-7.437	107.351	1.00	39.91
原子	642	CB	ALA	81	3.738	-6.065	107.535	1.00	28.92
原子	643	C	ALA	81	3.831	-8.161	106.216	1.00	39.91
原子	644	O	ALA	81	3.358	-8.145	105.077	1.00	39.91

原子	645	N	ILE	82	4.966	-8.782	106.516	1.00	31.35
原子	646	CA	ILE	82	5.691	-9.509	105.490	1.00	31.35
原子	647	CB	ILE	82	7.103	-9.899	105.959	1.00	31.86
原子	648	CG2	ILE	82	7.746	-10.830	104.943	1.00	31.86
原子	649	CG1	ILE	82	7.948	-8.634	106.151	1.00	31.86
原子	650	CD1	ILE	82	9.372	-8.905	106.571	1.00	31.86
原子	651	C	ILE	82	4.919	-10.759	105.095	1.00	31.35
原子	652	O	ILE	82	4.763	-11.041	103.904	1.00	31.35
原子	653	N	ASN	83	4.420	-11.503	106.080	1.00	44.39
原子	654	CA	ASN	83	3.660	-12.712	105.778	1.00	44.39
原子	655	CB	ASN	83	3.253	-13.449	107.064	1.00	33.35
原子	656	CG	ASN	83	4.427	-14.137	107.747	1.00	33.35
原子	657	OD1	ASN	83	5.289	-14.727	107.092	1.00	33.35
原子	658	ND2	ASN	83	4.454	-14.078	109.075	1.00	33.35
原子	659	C	ASN	83	2.411	-12.393	104.949	1.00	44.39
原子	660	O	ASN	83	1.936	-13.236	104.186	1.00	44.39
原子	661	N	ALA	84	1.888	-11.178	105.086	1.00	41.69
原子	662	CA	ALA	84	0.698	-10.777	104.334	1.00	41.69
原子	663	CB	ALA	84	-0.061	-9.684	105.090	1.00	35.44
原子	664	C	ALA	84	1.026	-10.294	102.919	1.00	41.69
原子	665	O	ALA	84	0.147	-10.231	102.059	1.00	41.69
原子	666	N	SER	85	2.285	-9.945	102.673	1.00	47.02
原子	667	CA	SER	85	2.681	-9.478	101.346	1.00	47.02
原子	668	CB	SER	85	3.952	-8.645	101.439	1.00	37.52
原子	669	OG	SER	85	5.037	-9.457	101.836	1.00	37.52
原子	670	C	SER	85	2.931	-10.663	100.421	1.00	47.02
原子	671	O	SER	85	2.773	-11.815	100.820	1.00	47.02
原子	672	N	ASP	86	3.330	-10.380	99.188	1.00	55.10
原子	673	CA	ASP	86	3.600	-11.438	98.226	1.00	55.10

原子	674	CB	ASP	86	2.856	-11.159	96.913	1.00	66.61
原子	675	CG	ASP	86	3.232	-9.821	96.292	1.00	66.61
原子	676	OD1	ASP	86	4.108	-9.119	96.841	1.00	66.61
原子	677	OD2	ASP	86	2.647	-9.468	95.244	1.00	66.61
原子	678	C	ASP	86	5.093	-11.593	97.955	1.00	55.10
原子	679	O	ASP	86	5.492	-12.136	96.921	1.00	55.10
原子	680	N	LEU	87	5.916	-11.127	98.889	1.00	40.02
原子	681	CA	LEU	87	7.368	-11.201	98.741	1.00	40.02
原子	682	CB	LEU	87	8.056	-10.528	99.931	1.00	53.14
原子	683	CG	LEU	87	7.867	-9.019	100.053	1.00	53.14
原子	684	CD1	LEU	87	8.549	-8.512	101.314	1.00	53.14
原子	685	CD2	LEU	87	8.446	-8.348	98.815	1.00	53.14
原子	686	C	LEU	87	7.924	-12.612	98.596	1.00	40.02
原子	687	O	LEU	87	8.967	-12.812	97.967	1.00	40.02
原子	688	N	GLY	88	7.233	-13.588	99.176	1.00	39.77
原子	689	CA	GLY	88	7.722	-14.951	99.109	1.00	39.77
原子	690	C	GLY	88	8.924	-15.046	100.028	1.00	39.77
原子	691	O	GLY	88	9.905	-15.733	99.740	1.00	39.77
原子	692	N	LEU	89	8.848	-14.319	101.138	1.00	36.60
原子	693	CA	LEU	89	9.907	-14.303	102.124	1.00	36.60
原子	694	CB	LEU	89	10.522	-12.909	102.221	1.00	41.00
原子	695	CG	LEU	89	11.343	-12.412	101.033	1.00	41.00
原子	696	CD1	LEU	89	11.804	-10.996	101.312	1.00	41.00
原子	697	CD2	LEU	89	12.539	-13.321	100.797	1.00	41.00
原子	698	C	LEU	89	9.348	-14.720	103.477	1.00	36.60
原子	699	O	LEU	89	8.186	-14.464	103.792	1.00	36.60
原子	700	N	ASN	90	10.185	-15.368	104.275	1.00	32.75
原子	701	CA	ASN	90	9.774	-15.834	105.585	1.00	32.75
原子	702	CB	ASN	90	9.973	-17.343	105.682	1.00	37.39

原子	703	CG	ASN	90	9.128	-18.104	104.682	1.00	37.39
原子	704	OD1	ASN	90	7.902	-18.176	104.813	1.00	37.39
原子	705	ND2	ASN	90	9.776	-18.671	103.670	1.00	37.39
原子	706	C	ASN	90	10.593	-15.141	106.651	1.00	32.75
原子	707	O	ASN	90	11.804	-15.323	106.731	1.00	32.75
原子	708	N	PRO	91	9.941	-14.330	107.484	1.00	35.24
原子	709	CD	PRO	91	8.503	-14.012	107.514	1.00	26.32
原子	710	CA	PRO	91	10.657	-13.620	108.543	1.00	35.24
原子	711	CB	PRO	91	9.597	-12.670	109.088	1.00	26.32
原子	712	CG	PRO	91	8.339	-13.443	108.899	1.00	26.32
原子	713	C	PRO	91	11.212	-14.545	109.621	1.00	35.24
原子	714	O	PRO	91	10.577	-15.528	110.004	1.00	35.24
原子	715	N	ILE	92	12.406	-14.224	110.099	1.00	39.44
原子	716	CA	ILE	92	13.050	-14.988	111.156	1.00	39.44
原子	717	CB	ILE	92	14.442	-15.457	110.736	1.00	30.73
原子	718	CG2	ILE	92	15.044	-16.318	111.833	1.00	30.73
原子	719	CG1	ILE	92	14.357	-16.256	109.440	1.00	30.73
原子	720	CD1	ILE	92	15.720	-16.628	108.899	1.00	30.73
原子	721	C	ILE	92	13.199	-14.016	112.323	1.00	39.44
原子	722	O	ILE	92	14.117	-13.200	112.347	1.00	39.44
原子	723	N	ASN	93	12.291	-14.109	113.287	1.00	37.86
原子	724	CA	ASN	93	12.275	-13.220	114.441	1.00	37.86
原子	725	CB	ASN	93	10.818	-12.947	114.804	1.00	26.31
原子	726	CG	ASN	93	10.660	-11.871	115.856	1.00	26.31
原子	727	OD1	ASN	93	11.627	-11.440	116.482	1.00	26.31
原子	728	ND2	ASN	93	9.426	-11.431	116.059	1.00	26.31
原子	729	C	ASN	93	13.015	-13.760	115.668	1.00	37.86
原子	730	O	ASN	93	12.538	-14.690	116.321	1.00	37.86
原子	731	N	ASP	94	14.166	-13.174	115.995	1.00	43.86

原子	732	CA	ASP	94	14.926	-13.613	117.167	1.00	43.86
原子	733	CB	ASP	94	16.429	-13.647	116.866	1.00	48.91
原子	734	CG	ASP	94	17.003	-12.274	116.625	1.00	48.91
原子	735	OD1	ASP	94	18.236	-12.162	116.455	1.00	48.91
原子	736	OD2	ASP	94	16.220	-11.305	116.603	1.00	48.91
原子	737	C	ASP	94	14.661	-12.696	118.366	1.00	43.86
原子	738	O	ASP	94	15.416	-12.690	119.339	1.00	43.86
原子	739	N	GLY	95	13.589	-11.914	118.286	1.00	38.45
原子	740	CA	GLY	95	13.233	-11.031	119.381	1.00	38.45
原子	741	C	GLY	95	14.025	-9.743	119.451	1.00	38.45
原子	742	O	GLY	95	13.756	-8.886	120.293	1.00	38.45
原子	743	N	ASN	96	15.008	-9.606	118.569	1.00	49.36
原子	744	CA	ASN	96	15.841	-8.410	118.525	1.00	49.36
原子	745	CB	ASN	96	17.296	-8.751	118.860	1.00	40.40
原子	746	CG	ASN	96	18.208	-7.532	118.808	1.00	40.40
原子	747	OD1	ASN	96	19.369	-7.620	118.399	1.00	40.40
原子	748	ND2	ASN	96	17.686	-6.388	119.232	1.00	40.40
原子	749	C	ASN	96	15.789	-7.849	117.116	1.00	49.36
原子	750	O	ASN	96	15.489	-6.679	116.901	1.00	49.36
原子	751	N	VAL	97	16.079	-8.716	116.158	1.00	44.00
原子	752	CA	VAL	97	16.105	-8.340	114.759	1.00	44.00
原子	753	CB	VAL	97	17.561	-8.390	114.253	1.00	36.85
原子	754	CG1	VAL	97	17.828	-9.690	113.506	1.00	36.85
原子	755	CG2	VAL	97	17.843	-7.197	113.413	1.00	36.85
原子	756	C	VAL	97	15.223	-9.276	113.923	1.00	44.00
原子	757	O	VAL	97	14.713	-10.279	114.422	1.00	44.00
原子	758	N	ILE	98	15.033	-8.938	112.653	1.00	37.43
原子	759	CA	ILE	98	14.240	-9.772	111.758	1.00	37.43
原子	760	CB	ILE	98	12.936	-9.084	111.332	1.00	38.61

原子	761	CG2	ILE	98	12.439	-9.659	110.012	1.00	38.61
原子	762	CG1	ILE	98	11.885	-9.281	112.420	1.00	38.61
原子	763	CD1	ILE	98	10.495	-8.910	111.987	1.00	38.61
原子	764	C	ILE	98	15.036	-10.105	110.515	1.00	37.43
原子	765	O	ILE	98	15.270	-9.236	109.677	1.00	37.43
原子	766	N	ARG	99	15.458	-11.365	110.410	1.00	30.52
原子	767	CA	ARG	99	16.232	-11.822	109.263	1.00	30.52
原子	768	CB	ARG	99	17.137	-13.004	109.625	1.00	50.62
原子	769	CG	ARG	99	18.429	-12.643	110.328	1.00	50.62
原子	770	CD	ARG	99	19.445	-13.758	110.162	1.00	50.62
原子	771	NE	ARG	99	18.996	-15.003	110.777	1.00	50.62
原子	772	CZ	ARG	99	19.434	-16.213	110.440	1.00	50.62
原子	773	NH1	ARG	99	20.340	-16.363	109.479	1.00	50.62
原子	774	NH2	ARG	99	18.962	-17.277	111.074	1.00	50.62
原子	775	C	ARG	99	15.307	-12.244	108.151	1.00	30.52
原子	776	O	ARG	99	14.242	-12.809	108.385	1.00	30.52
原子	777	N	LEU	100	15.729	-11.957	106.932	1.00	33.80
原子	778	CA	LEU	100	14.973	-12.307	105.743	1.00	33.80
原子	779	CB	LEU	100	14.399	-11.042	105.117	1.00	34.63
原子	780	CG	LEU	100	12.890	-10.941	104.938	1.00	34.63
原子	781	CD1	LEU	100	12.167	-11.437	106.178	1.00	34.63
原子	782	CD2	LEU	100	12.542	-9.493	104.636	1.00	34.63
原子	783	C	LEU	100	16.011	-12.928	104.829	1.00	33.80
原子	784	O	LEU	100	16.829	-12.225	104.247	1.00	33.80
原子	785	N	VAL	101	16.006	-14.248	104.725	1.00	40.27
原子	786	CA	VAL	101	16.989	-14.911	103.887	1.00	40.27
原子	787	CB	VAL	101	17.377	-16.271	104.470	1.00	42.80
原子	788	CG1	VAL	101	18.462	-16.902	103.621	1.00	42.80
原子	789	CG2	VAL	101	17.867	-16.097	105.888	1.00	42.80

原子	790	C	VAL	101	16.481	-15.087	102.467	1.00	40.27
原子	791	O	VAL	101	15.288	-15.295	102.248	1.00	40.27
原子	792	N	PHE	102	17.396	-14.988	101.506	1.00	42.62
原子	793	CA	PHE	102	17.065	-15.120	100.091	1.00	42.62
原子	794	CB	PHE	102	17.504	-13.870	99.325	1.00	35.61
原子	795	CG	PHE	102	16.807	-12.614	99.755	1.00	35.61
原子	796	CD1	PHE	102	17.012	-12.089	101.026	1.00	35.61
原子	797	CD2	PHE	102	15.936	-11.955	98.889	1.00	35.61
原子	798	CE1	PHE	102	16.365	-10.926	101.427	1.00	35.61
原子	799	CE2	PHE	102	15.286	-10.793	99.284	1.00	35.61
原子	800	CZ	PHE	102	15.498	-10.280	100.553	1.00	35.61
原子	801	C	PHE	102	17.758	-16.330	99.481	1.00	42.62
原子	802	O	PHE	102	18.853	-16.210	98.938	1.00	42.62
原子	803	N	PRO	103	17.123	-17.509	99.542	1.00	35.91
原子	804	CD	PRO	103	15.787	-17.769	100.101	1.00	36.33
原子	805	CA	PRO	103	17.710	-18.739	98.983	1.00	35.91
原子	806	CB	PRO	103	16.665	-19.811	99.313	1.00	36.33
原子	807	CG	PRO	103	15.900	-19.221	100.488	1.00	36.33
原子	808	C	PRO	103	17.961	-18.650	97.472	1.00	35.91
原子	809	O	PRO	103	17.379	-17.803	96.789	1.00	35.91
原子	810	N	SER	104	18.833	-19.516	96.958	1.00	42.91
原子	811	CA	SER	104	19.119	-19.556	95.524	1.00	42.91
原子	812	CB	SER	104	19.973	-20.773	95.166	1.00	41.87
原子	813	OG	SER	104	21.321	-20.599	95.559	1.00	41.87
原子	814	C	SER	104	17.779	-19.663	94.820	1.00	42.91
原子	815	O	SER	104	16.993	-20.575	95.089	1.00	42.91
原子	816	N	PRO	105	17.494	-18.735	93.905	1.00	35.96
原子	817	CD	PRO	105	18.214	-17.490	93.571	1.00	31.16
原子	818	CA	PRO	105	16.195	-18.829	93.228	1.00	35.96

原子	819	CB	PRO	105	16.084	-17.493	92.488	1.00	31.16
原子	820	CG	PRO	105	17.542	-17.062	92.303	1.00	31.16
原子	821	C	PRO	105	15.989	-20.037	92.322	1.00	35.96
原子	822	O	PRO	105	16.929	-20.569	91.726	1.00	35.96
原子	823	N	THR	106	14.740	-20.472	92.249	1.00	50.79
原子	824	CA	THR	106	14.354	-21.596	91.410	1.00	50.79
原子	825	CB	THR	106	13.050	-22.237	91.919	1.00	55.41
原子	826	OG1	THR	106	11.965	-21.318	91.742	1.00	55.41
原子	827	CG2	THR	106	13.166	-22.582	93.399	1.00	55.41
原子	828	C	THR	106	14.110	-21.029	90.015	1.00	50.79
原子	829	O	THR	106	13.845	-19.833	89.865	1.00	50.79
原子	830	N	THR	107	14.187	-21.871	88.990	1.00	61.13
原子	831	CA	THR	107	13.973	-21.366	87.643	1.00	61.13
原子	832	CB	THR	107	14.421	-22.403	86.562	1.00	71.51
原子	833	OG1	THR	107	15.405	-21.800	85.707	1.00	71.51
原子	834	CG2	THR	107	13.244	-22.863	85.713	1.00	71.51
原子	835	C	THR	107	12.515	-20.960	87.454	1.00	61.13
原子	836	O	THR	107	12.166	-20.321	86.471	1.00	61.13
原子	837	N	GLU	108	11.663	-21.311	88.405	1.00	63.04
原子	838	CA	GLU	108	10.262	-20.940	88.297	1.00	63.04
原子	839	CB	GLU	108	9.377	-21.956	89.023	1.00	93.70
原子	840	CG	GLU	108	8.021	-22.149	88.359	1.00	93.70
原子	841	CD	GLU	108	7.250	-23.329	88.922	1.00	93.70
原子	842	OE1	GLU	108	6.636	-23.184	90.001	1.00	93.70
原子	843	OE2	GLU	108	7.266	-24.406	88.286	1.00	93.70
原子	844	C	GLU	108	10.077	-19.544	88.891	1.00	63.04
原子	845	O	GLU	108	9.144	-18.822	88.526	1.00	63.04
原子	846	N	GLN	109	10.968	-19.173	89.808	1.00	42.84
原子	847	CA	GLN	109	10.924	-17.854	90.429	1.00	42.84

原子	848	CB	GLN	109	11.763	-17.824	91.710	1.00	42.35
原子	849	CG	GLN	109	11.132	-18.557	92.890	1.00	42.35
原子	850	CD	GLN	109	11.971	-18.472	94.156	1.00	42.35
原子	851	OE1	GLN	109	13.094	-18.964	94.204	1.00	42.35
原子	852	NE2	GLN	109	11.423	-17.842	95.186	1.00	42.35
原子	853	C	GLN	109	11.473	-16.836	89.434	1.00	42.84
原子	854	O	GLN	109	10.866	-15.794	89.200	1.00	42.84
原子	855	N	ARG	110	12.624	-17.148	88.846	1.00	37.85
原子	856	CA	ARG	110	13.237	-16.258	87.873	1.00	37.85
原子	857	CB	ARG	110	14.464	-16.909	87.244	1.00	51.08
原子	858	CG	ARG	110	15.598	-17.191	88.202	1.00	51.08
原子	859	CD	ARG	110	16.692	-17.973	87.495	1.00	51.08
原子	860	NE	ARG	110	17.755	-18.390	88.405	1.00	51.08
原子	861	CZ	ARG	110	18.663	-17.569	88.927	1.00	51.08
原子	862	NH1	ARG	110	18.644	-16.275	88.629	1.00	51.08
原子	863	NH2	ARG	110	19.592	-18.042	89.751	1.00	51.08
原子	864	C	ARG	110	12.224	-15.946	86.783	1.00	37.85
原子	865	O	ARG	110	11.986	-14.782	86.457	1.00	37.85
原子	866	N	ALA	111	11.623	-16.992	86.224	1.00	49.18
原子	867	CA	ALA	111	10.634	-16.817	85.168	1.00	49.18
原子	868	CB	ALA	111	10.130	-18.172	84.682	1.00	35.40
原子	869	C	ALA	111	9.473	-15.978	85.689	1.00	49.18
原子	870	O	ALA	111	8.913	-15.158	84.961	1.00	49.18
原子	871	N	LYS	112	9.119	-16.175	86.954	1.00	39.11
原子	872	CA	LYS	112	8.023	-15.416	87.545	1.00	39.11
原子	873	CB	LYS	112	7.687	-15.945	88.940	1.00	85.43
原子	874	CG	LYS	112	6.573	-15.162	89.618	1.00	85.43
原子	875	CD	LYS	112	6.468	-15.473	91.105	1.00	85.43
原子	876	CE	LYS	112	5.400	-14.606	91.768	1.00	85.43

原子	877	NZ	LYS	112	5.303	-14.821	93.242	1.00	85.43
原子	878	C	LYS	112	8.380	-13.936	87.642	1.00	39.11
原子	879	O	LYS	112	7.586	-13.076	87.268	1.00	39.11
原子	880	N	TRP	113	9.578	-13.649	88.146	1.00	31.83
原子	881	CA	TRP	113	10.042	-12.274	88.299	1.00	31.83
原子	882	CB	TRP	113	11.368	-12.237	89.075	1.00	25.54
原子	883	CG	TRP	113	11.256	-12.810	90.459	1.00	25.54
原子	884	CD2	TRP	113	12.278	-13.490	91.203	1.00	25.54
原子	885	CE2	TRP	113	11.711	-13.879	92.434	1.00	25.54
原子	886	CE3	TRP	113	13.618	-13.816	90.945	1.00	25.54
原子	887	CD1	TRP	113	10.149	-12.803	91.253	1.00	25.54
原子	888	NE1	TRP	113	10.411	-13.443	92.439	1.00	25.54
原子	889	CZ2	TRP	113	12.434	-14.574	93.412	1.00	25.54
原子	890	CZ3	TRP	113	14.342	-14.510	91.927	1.00	25.54
原子	891	CH2	TRP	113	13.744	-14.881	93.140	1.00	25.54
原子	892	C	TRP	113	10.202	-11.542	86.966	1.00	31.83
原子	893	O	TRP	113	9.883	-10.362	86.868	1.00	31.83
原子	894	N	VAL	114	10.694	-12.235	85.944	1.00	37.08
原子	895	CA	VAL	114	10.873	-11.619	84.631	1.00	37.08
原子	896	CB	VAL	114	11.568	-12.588	83.636	1.00	25.80
原子	897	CG1	VAL	114	11.544	-12.001	82.229	1.00	25.80
原子	898	CG2	VAL	114	13.006	-12.844	84.067	1.00	25.80
原子	899	C	VAL	114	9.504	-11.247	84.078	1.00	37.08
原子	900	O	VAL	114	9.323	-10.198	83.456	1.00	37.08
原子	901	N	LYS	115	8.540	-12.122	84.314	1.00	37.76
原子	902	CA	LYS	115	7.177	-11.911	83.861	1.00	37.76
原子	903	CB	LYS	115	6.345	-13.151	84.189	1.00	60.43
原子	904	CG	LYS	115	5.206	-13.437	83.232	1.00	60.43
原子	905	CD	LYS	115	3.844	-13.292	83.904	1.00	60.43

原子	906	CE	LYS	115	2.935	-14.479	83.591	1.00	60.43
原子	907	NZ	LYS	115	1.512	-14.209	83.953	1.00	60.43
原子	908	C	LYS	115	6.613	-10.682	84.580	1.00	37.76
原子	909	O	LYS	115	5.863	-9.895	83.999	1.00	37.76
原子	910	N	LYS	116	6.988	-10.519	85.847	1.00	44.68
原子	911	CA	LYS	116	6.528	-9.392	86.649	1.00	44.68
原子	912	CB	LYS	116	6.848	-9.639	88.124	1.00	47.83
原子	913	CG	LYS	116	6.427	-8.510	89.052	1.00	47.83
原子	914	CD	LYS	116	6.846	-8.804	90.480	1.00	47.83
原子	915	CE	LYS	116	6.582	-7.623	91.400	1.00	47.83
原子	916	NZ	LYS	116	7.136	-7.862	92.768	1.00	47.83
原子	917	C	LYS	116	7.174	-8.081	86.184	1.00	44.68
原子	918	O	LYS	116	6.527	-7.029	86.162	1.00	44.68
原子	919	N	ALA	117	8.450	-8.142	85.816	1.00	31.99
原子	920	CA	ALA	117	9.152	-6.959	85.345	1.00	31.99
原子	921	CB	ALA	117	10.615	-7.272	85.121	1.00	21.76
原子	922	C	ALA	117	8.525	-6.491	84.043	1.00	31.99
原子	923	O	ALA	117	8.311	-5.302	83.832	1.00	31.99
原子	924	N	LYS	118	8.222	-7.443	83.173	1.00	40.71
原子	925	CA	LYS	118	7.632	-7.137	81.883	1.00	40.71
原子	926	CB	LYS	118	7.499	-8.421	81.063	1.00	61.77
原子	927	CG	LYS	118	7.281	-8.200	79.577	1.00	61.77
原子	928	CD	LYS	118	7.510	-9.495	78.812	1.00	61.77
原子	929	CE	LYS	118	7.974	-9.237	77.381	1.00	61.77
原子	930	NZ	LYS	118	8.495	-10.490	76.749	1.00	61.77
原子	931	C	LYS	118	6.271	-6.474	82.027	1.00	40.71
原子	932	O	LYS	118	5.953	-5.529	81.312	1.00	40.71
原子	933	N	GLU	119	5.462	-6.956	82.956	1.00	33.86
原子	934	CA	GLU	119	4.140	-6.377	83.111	1.00	33.86

原子	935	CB	GLU	119	3.274	-7.279	83.991	1.00	64.63
原子	936	CG	GLU	119	1.788	-7.224	83.639	1.00	64.63
原子	937	CD	GLU	119	1.530	-7.160	82.133	1.00	64.63
原子	938	OE1	GLU	119	0.818	-6.227	81.703	1.00	64.63
原子	939	OE2	GLU	119	2.032	-8.028	81.381	1.00	64.63
原子	940	C	GLU	119	4.245	-4.962	83.674	1.00	33.86
原子	941	O	GLU	119	3.429	-4.095	83.362	1.00	33.86
原子	942	N	ILE	120	5.270	-4.730	84.487	1.00	30.00
原子	943	CA	ILE	120	5.500	-3.420	85.063	1.00	30.00
原子	944	CB	ILE	120	6.656	-3.458	86.100	1.00	30.15
原子	945	CG2	ILE	120	7.168	-2.049	86.372	1.00	30.15
原子	946	CG1	ILE	120	6.176	-4.116	87.398	1.00	30.15
原子	947	CD1	ILE	120	7.292	-4.435	88.385	1.00	30.15
原子	948	C	ILE	120	5.882	-2.461	83.935	1.00	30.00
原子	949	O	ILE	120	5.408	-1.325	83.882	1.00	30.00
原子	950	N	VAL	121	6.741	-2.927	83.035	1.00	35.95
原子	951	CA	VAL	121	7.188	-2.105	81.923	1.00	35.95
原子	952	CB	VAL	121	8.459	-2.707	81.278	1.00	26.65
原子	953	CG1	VAL	121	8.765	-2.014	79.968	1.00	26.65
原子	954	CG2	VAL	121	9.636	-2.547	82.230	1.00	26.65
原子	955	C	VAL	121	6.094	-1.913	80.869	1.00	35.95
原子	956	O	VAL	121	6.014	-0.854	80.230	1.00	35.95
原子	957	N	GLU	122	5.261	-2.934	80.674	1.00	34.93
原子	958	CA	GLU	122	4.169	-2.822	79.718	1.00	34.93
原子	959	CB	GLU	122	3.357	-4.114	79.647	1.00	40.08
原子	960	CG	GLU	122	3.868	-5.140	78.652	1.00	40.08
原子	961	CD	GLU	122	3.852	-4.634	77.226	1.00	40.08
原子	962	OE1	GLU	122	4.946	-4.398	76.666	1.00	40.08
原子	963	OE2	GLU	122	2.747	-4.469	76.667	1.00	40.08

原子	964	C	GLU	122	3.260	-1.697	80.191	1.00	34.93
原子	965	O	GLU	122	2.807	-0.877	79.397	1.00	34.93
原子	966	N	GLU	123	2.992	-1.665	81.491	1.00	32.96
原子	967	CA	GLU	123	2.138	-0.630	82.043	1.00	32.96
原子	968	CB	GLU	123	1.928	-0.843	83.547	1.00	59.85
原子	969	CG	GLU	123	0.992	-1.999	83.912	1.00	59.85
原子	970	CD	GLU	123	-0.405	-1.850	83.318	1.00	59.85
原子	971	OE1	GLU	123	-0.950	-0.726	83.334	1.00	59.85
原子	972	OE2	GLU	123	-0.970	-2.860	82.843	1.00	59.85
原子	973	C	GLU	123	2.732	0.753	81.785	1.00	32.96
原子	974	O	GLU	123	2.006	1.695	81.462	1.00	32.96
原子	975	N	GLY	124	4.052	0.870	81.920	1.00	39.02
原子	976	CA	GLY	124	4.707	2.147	81.690	1.00	39.02
原子	977	C	GLY	124	4.549	2.599	80.249	1.00	39.02
原子	978	O	GLY	124	4.365	3.783	79.972	1.00	39.02
原子	979	N	LYS	125	4.620	1.643	79.328	1.00	35.24
原子	980	CA	LYS	125	4.474	1.925	77.909	1.00	35.24
原子	981	CB	LYS	125	4.620	0.661	77.098	1.00	34.74
原子	982	CG	LYS	125	5.913	-0.048	77.285	1.00	34.74
原子	983	CD	LYS	125	5.958	-1.196	76.321	1.00	34.74
原子	984	CE	LYS	125	7.363	-1.576	76.003	1.00	34.74
原子	985	NZ	LYS	125	7.313	-2.617	74.961	1.00	34.74
原子	986	C	LYS	125	3.097	2.466	77.638	1.00	35.24
原子	987	O	LYS	125	2.926	3.440	76.893	1.00	35.24
原子	988	N	ILE	126	2.104	1.794	78.215	1.00	32.74
原子	989	CA	ILE	126	0.725	2.208	78.047	1.00	32.74
原子	990	CB	ILE	126	-0.219	1.320	78.864	1.00	29.38
原子	991	CG2	ILE	126	-1.642	1.859	78.801	1.00	29.38
原子	992	CG1	ILE	126	-0.154	-0.112	78.335	1.00	29.38

原子	993	CD1	ILE	126	-1.019	-1.088	79.110	1.00	29.38
原子	994	C	ILE	126	0.628	3.650	78.522	1.00	32.74
原子	995	O	ILE	126	-0.019	4.475	77.885	1.00	32.74
原子	996	N	ALA	127	1.302	3.956	79.626	1.00	29.45
原子	997	CA	ALA	127	1.284	5.309	80.166	1.00	29.45
原子	998	CB	ALA	127	2.028	5.356	81.501	1.00	24.11
原子	999	C	ALA	127	1.922	6.273	79.170	1.00	29.45
原子	1000	O	ALA	127	1.434	7.386	78.978	1.00	29.45
原子	1001	N	ILE	128	3.013	5.847	78.536	1.00	32.93
原子	1002	CA	ILE	128	3.691	6.687	77.552	1.00	32.93
原子	1003	CB	ILE	128	4.936	5.983	76.957	1.00	23.94
原子	1004	CG2	ILE	128	5.442	6.742	75.725	1.00	23.94
原子	1005	CG1	ILE	128	6.031	5.871	78.021	1.00	23.94
原子	1006	CD1	ILE	128	6.454	7.190	78.612	1.00	23.94
原子	1007	C	ILE	128	2.732	7.015	76.413	1.00	32.93
原子	1008	O	ILE	128	2.524	8.173	76.077	1.00	32.93
原子	1009	N	ARG	129	2.142	5.985	75.826	1.00	31.09
原子	1010	CA	ARG	129	1.221	6.190	74.731	1.00	31.09
原子	1011	CB	ARG	129	0.764	4.844	74.183	1.00	31.49
原子	1012	CG	ARG	129	1.917	3.977	73.731	1.00	31.49
原子	1013	CD	ARG	129	1.471	2.930	72.738	1.00	31.49
原子	1014	NE	ARG	129	2.600	2.124	72.292	1.00	31.49
原子	1015	CZ	ARG	129	2.977	0.984	72.858	1.00	31.49
原子	1016	NH1	ARG	129	2.300	0.510	73.894	1.00	31.49
原子	1017	NH2	ARG	129	4.040	0.326	72.396	1.00	31.49
原子	1018	C	ARG	129	0.016	7.040	75.110	1.00	31.09
原子	1019	O	ARG	129	-0.590	7.665	74.242	1.00	31.09
原子	1020	N	ASN	130	-0.348	7.069	76.389	1.00	30.83
原子	1021	CA	ASN	130	-1.489	7.881	76.786	1.00	30.83

原子	1022	CB	ASN	130	-1.981	7.517	78.193	1.00	39.26
原子	1023	CG	ASN	130	-2.935	6.328	78.185	1.00	39.26
原子	1024	OD1	ASN	130	-3.616	6.075	77.188	1.00	39.26
原子	1025	ND2	ASN	130	-3.005	5.610	79.301	1.00	39.26
原子	1026	C	ASN	130	-1.083	9.340	76.732	1.00	30.83
原子	1027	O	ASN	130	-1.826	10.185	76.230	1.00	30.83
原子	1028	N	ILE	131	0.108	9.627	77.247	1.00	30.20
原子	1029	CA	ILE	131	0.635	10.981	77.229	1.00	30.20
原子	1030	CB	ILE	131	2.061	11.008	77.807	1.00	27.12
原子	1031	CG2	ILE	131	2.740	12.339	77.485	1.00	27.12
原子	1032	CG1	ILE	131	2.003	10.728	79.310	1.00	27.12
原子	1033	CD1	ILE	131	3.357	10.540	79.955	1.00	27.12
原子	1034	C	ILE	131	0.655	11.475	75.780	1.00	30.20
原子	1035	O	ILE	131	0.271	12.607	75.493	1.00	30.20
原子	1036	N	ARG	132	1.094	10.610	74.869	1.00	30.22
原子	1037	CA	ARG	132	1.149	10.943	73.452	1.00	30.22
原子	1038	CB	ARG	132	1.653	9.744	72.649	1.00	38.82
原子	1039	CG	ARG	132	1.395	9.844	71.152	1.00	38.82
原子	1040	CD	ARG	132	1.837	8.584	70.433	1.00	38.82
原子	1041	NE	ARG	132	1.578	8.664	69.003	1.00	38.82
原子	1042	CZ	ARG	132	0.370	8.586	68.441	1.00	38.82
原子	1043	NH1	ARG	132	-0.718	8.412	69.185	1.00	38.82
原子	1044	NH2	ARG	132	0.245	8.714	67.125	1.00	38.82
原子	1045	C	ARG	132	-0.221	11.359	72.926	1.00	30.22
原子	1046	O	ARG	132	-0.356	12.389	72.271	1.00	30.22
原子	1047	N	ARG	133	-1.236	10.549	73.213	1.00	41.63
原子	1048	CA	ARG	133	-2.593	10.829	72.757	1.00	41.63
原子	1049	CB	ARG	133	-3.498	9.635	73.059	1.00	50.13
原子	1050	CG	ARG	133	-4.978	9.972	73.139	1.00	50.13

原子	1051	CD	ARG	133	-5.837	8.757	72.843	1.00	50.13
原子	1052	NE	ARG	133	-5.188	7.531	73.287	1.00	50.13
原子	1053	CZ	ARG	133	-5.005	7.195	74.560	1.00	50.13
原子	1054	NH1	ARG	133	-5.432	7.992	75.537	1.00	50.13
原子	1055	NH2	ARG	133	-4.373	6.066	74.854	1.00	50.13
原子	1056	C	ARG	133	-3.209	12.105	73.328	1.00	41.63
原子	1057	O	ARG	133	-3.878	12.844	72.611	1.00	41.63
原子	1058	N	GLU	134	-2.989	12.366	74.612	1.00	37.67
原子	1059	CA	GLU	134	-3.550	13.559	75.234	1.00	37.67
原子	1060	CB	GLU	134	-3.257	13.580	76.738	1.00	95.55
原子	1061	CG	GLU	134	-1.777	13.566	77.082	1.00	95.55
原子	1062	CD	GLU	134	-1.425	14.478	78.245	1.00	95.55
原子	1063	OE1	GLU	134	-0.804	13.991	79.218	1.00	95.55
原子	1064	OE2	GLU	134	-1.763	15.682	78.179	1.00	95.55
原子	1065	C	GLU	134	-2.996	14.826	74.594	1.00	37.67
原子	1066	O	GLU	134	-3.747	15.736	74.254	1.00	37.67
原子	1067	N	ILE	135	-1.678	14.874	74.431	1.00	35.92
原子	1068	CA	ILE	135	-1.016	16.031	73.850	1.00	35.92
原子	1069	CB	ILE	135	0.513	15.905	73.985	1.00	39.63
原子	1070	CG2	ILE	135	1.200	17.111	73.381	1.00	39.63
原子	1071	CG1	ILE	135	0.875	15.794	75.464	1.00	39.63
原子	1072	CD1	ILE	135	2.359	15.720	75.741	1.00	39.63
原子	1073	C	ILE	135	-1.382	16.183	72.386	1.00	35.92
原子	1074	O	ILE	135	-1.687	17.281	71.920	1.00	35.92
原子	1075	N	LEU	136	-1.354	15.072	71.665	1.00	41.46
原子	1076	CA	LEU	136	-1.682	15.081	70.254	1.00	41.46
原子	1077	CB	LEU	136	-1.679	13.655	69.711	1.00	34.36
原子	1078	CG	LEU	136	-0.757	13.364	68.526	1.00	34.36
原子	1079	CD1	LEU	136	0.525	14.169	68.631	1.00	34.36

原子	1080	CD2	LEU	136	-0.460	11.869	68.494	1.00	34.36
原子	1081	C	LEU	136	-3.030	15.745	70.004	1.00	41.46
原子	1082	O	LEU	136	-3.172	16.506	69.056	1.00	41.46
原子	1083	N	LYS	137	-4.020	15.484	70.850	1.00	45.83
原子	1084	CA	LYS	137	-5.318	16.109	70.634	1.00	45.83
原子	1085	CB	LYS	137	-6.449	15.330	71.326	1.00	74.57
原子	1086	CG	LYS	137	-6.404	15.320	72.835	1.00	74.57
原子	1087	CD	LYS	137	-7.364	14.283	73.409	1.00	74.57
原子	1088	CE	LYS	137	-8.739	14.854	73.707	1.00	74.57
原子	1089	NZ	LYS	137	-9.587	13.839	74.405	1.00	74.57
原子	1090	C	LYS	137	-5.311	17.559	71.087	1.00	45.83
原子	1091	O	LYS	137	-6.112	18.355	70.611	1.00	45.83
原子	1092	N	LYS	138	-4.421	17.911	72.008	1.00	38.48
原子	1093	CA	LYS	138	-4.343	19.298	72.434	1.00	38.48
原子	1094	CB	LYS	138	-3.485	19.450	73.689	1.00	46.05
原子	1095	CG	LYS	138	-4.322	19.614	74.943	1.00	46.05
原子	1096	CD	LYS	138	-3.486	19.890	76.177	1.00	46.05
原子	1097	CE	LYS	138	-2.736	18.654	76.639	1.00	46.05
原子	1098	NZ	LYS	138	-2.026	18.906	77.934	1.00	46.05
原子	1099	C	LYS	138	-3.751	20.104	71.278	1.00	38.48
原子	1100	O	LYS	138	-4.104	21.266	71.070	1.00	38.48
原子	1101	N	ILE	139	-2.859	19.476	70.518	1.00	31.21
原子	1102	CA	ILE	139	-2.255	20.128	69.366	1.00	31.21
原子	1103	CB	ILE	139	-1.038	19.329	68.845	1.00	30.83
原子	1104	CG2	ILE	139	-0.604	19.859	67.490	1.00	30.83
原子	1105	CG1	ILE	139	0.124	19.430	69.840	1.00	30.83
原子	1106	CD1	ILE	139	1.240	18.448	69.571	1.00	30.83
原子	1107	C	ILE	139	-3.311	20.222	68.264	1.00	31.21
原子	1108	O	ILE	139	-3.432	21.249	67.600	1.00	31.21

原子	1109	N	LYS	140	-4.077	19.147	68.081	1.00	37.01
原子	1110	CA	LYS	140	-5.129	19.105	67.068	1.00	37.01
原子	1111	CB	LYS	140	-5.858	17.765	67.111	1.00	60.99
原子	1112	CG	LYS	140	-6.134	17.149	65.751	1.00	60.99
原子	1113	CD	LYS	140	-4.888	16.462	65.195	1.00	60.99
原子	1114	CE	LYS	140	-5.206	15.633	63.949	1.00	60.99
原子	1115	NZ	LYS	140	-4.049	14.793	63.505	1.00	60.99
原子	1116	C	LYS	140	-6.136	20.223	67.322	1.00	37.01
原子	1117	O	LYS	140	-6.665	20.828	66.383	1.00	37.01
原子	1118	N	GLU	141	-6.402	20.485	68.599	1.00	32.47
原子	1119	CA	GLU	141	-7.335	21.527	68.994	1.00	32.47
原子	1120	CB	GLU	141	-7.497	21.545	70.512	1.00	56.18
原子	1121	CG	GLU	141	-8.789	20.933	71.011	1.00	56.18
原子	1122	CD	GLU	141	-8.646	20.300	72.394	1.00	56.18
原子	1123	OE1	GLU	141	-8.088	20.951	73.310	1.00	56.18
原子	1124	OE2	GLU	141	-9.102	19.146	72.562	1.00	56.18
原子	1125	C	GLU	141	-6.797	22.862	68.527	1.00	32.47
原子	1126	O	GLU	141	-7.491	23.630	67.860	1.00	32.47
原子	1127	N	ASP	142	-5.548	23.135	68.887	1.00	43.49
原子	1128	CA	ASP	142	-4.911	24.379	68.504	1.00	43.49
原子	1129	CB	ASP	142	-3.510	24.449	69.105	1.00	40.36
原子	1130	CG	ASP	142	-3.523	24.880	70.557	1.00	40.36
原子	1131	OD1	ASP	142	-4.599	24.852	71.180	1.00	40.36
原子	1132	OD2	ASP	142	-2.455	25.246	71.082	1.00	40.36
原子	1133	C	ASP	142	-4.860	24.497	66.987	1.00	43.49
原子	1134	O	ASP	142	-5.002	25.592	66.443	1.00	43.49
原子	1135	N	GLN	143	-4.667	23.374	66.302	1.00	38.41
原子	1136	CA	GLN	143	-4.634	23.401	64.848	1.00	38.41
原子	1137	CB	GLN	143	-4.197	22.045	64.270	1.00	36.16

原子	1138	CG	GLN	143	-4.584	21.868	62.799	1.00	36.16
原子	1139	CD	GLN	143	-4.063	20.585	62.152	1.00	36.16
原子	1140	OE1	GLN	143	-3.863	19.562	62.814	1.00	36.16
原子	1141	NE2	GLN	143	-3.869	20.632	60.843	1.00	36.16
原子	1142	C	GLN	143	-6.025	23.757	64.329	1.00	38.41
原子	1143	O	GLN	143	-6.161	24.502	63.362	1.00	38.41
原子	1144	N	LYS	144	-7.060	23.238	64.981	1.00	41.80
原子	1145	CA	LYS	144	-8.428	23.511	64.549	1.00	41.80
原子	1146	CB	LYS	144	-9.405	22.591	65.283	1.00	70.22
原子	1147	CG	LYS	144	-10.807	22.637	64.711	1.00	70.22
原子	1148	CD	LYS	144	-11.689	21.509	65.226	1.00	70.22
原子	1149	CE	LYS	144	-13.040	21.518	64.514	1.00	70.22
原子	1150	NZ	LYS	144	-13.922	20.387	64.915	1.00	70.22
原子	1151	C	LYS	144	-8.840	24.982	64.730	1.00	41.80
原子	1152	O	LYS	144	-9.540	25.542	63.885	1.00	41.80
原子	1153	N	GLU	145	-8.404	25.616	65.814	1.00	32.59
原子	1154	CA	GLU	145	-8.753	27.020	66.029	1.00	32.59
原子	1155	CB	GLU	145	-8.406	27.480	67.435	1.00	54.82
原子	1156	CG	GLU	145	-8.937	26.652	68.554	1.00	54.82
原子	1157	CD	GLU	145	-8.574	27.273	69.878	1.00	54.82
原子	1158	OE1	GLU	145	-8.448	26.529	70.874	1.00	54.82
原子	1159	OE2	GLU	145	-8.418	28.515	69.915	1.00	54.82
原子	1160	C	GLU	145	-7.997	27.933	65.078	1.00	32.59
原子	1161	O	GLU	145	-8.346	29.108	64.938	1.00	32.59
原子	1162	N	GLY	146	-6.938	27.406	64.463	1.00	27.98
原子	1163	CA	GLY	146	-6.153	28.200	63.539	1.00	27.98
原子	1164	C	GLY	146	-4.874	28.738	64.154	1.00	27.98
原子	1165	O	GLY	146	-4.094	29.421	63.487	1.00	27.98
原子	1166	N	LEU	147	-4.654	28.437	65.429	1.00	31.04

原子	1167	CA	LEU	147	-3.451	28.896	66.108	1.00	31.04
原子	1168	CB	LEU	147	-3.506	28.528	67.590	1.00	33.77
原子	1169	CG	LEU	147	-4.561	29.240	68.439	1.00	33.77
原子	1170	CD1	LEU	147	-4.518	28.698	69.852	1.00	33.77
原子	1171	CD2	LEU	147	-4.293	30.738	68.437	1.00	33.77
原子	1172	C	LEU	147	-2.211	28.269	65.481	1.00	31.04
原子	1173	O	LEU	147	-1.216	28.947	65.227	1.00	31.04
原子	1174	N	ILE	148	-2.285	26.965	65.239	1.00	38.27
原子	1175	CA	ILE	148	-1.182	26.213	64.658	1.00	38.27
原子	1176	CB	ILE	148	-0.917	24.931	65.461	1.00	29.04
原子	1177	CG2	ILE	148	0.141	24.102	64.778	1.00	29.04
原子	1178	CG1	ILE	148	-0.503	25.287	66.884	1.00	29.04
原子	1179	CD1	ILE	148	-0.470	24.104	67.811	1.00	29.04
原子	1180	C	ILE	148	-1.517	25.811	63.236	1.00	38.27
原子	1181	O	ILE	148	-2.359	24.936	63.021	1.00	38.27
原子	1182	N	PRO	149	-0.872	26.446	62.243	1.00	34.71
原子	1183	CD	PRO	149	0.123	27.528	62.327	1.00	39.35
原子	1184	CA	PRO	149	-1.157	26.094	60.849	1.00	34.71
原子	1185	CB	PRO	149	-0.294	27.079	60.053	1.00	39.35
原子	1186	CG	PRO	149	0.821	27.421	60.993	1.00	39.35
原子	1187	C	PRO	149	-0.806	24.633	60.592	1.00	34.71
原子	1188	O	PRO	149	0.086	24.083	61.236	1.00	34.71
原子	1189	N	GLU	150	-1.518	24.010	59.657	1.00	45.51
原子	1190	CA	GLU	150	-1.319	22.602	59.315	1.00	45.51
原子	1191	CB	GLU	150	-1.953	22.304	57.960	1.00	61.98
原子	1192	CG	GLU	150	-1.981	20.829	57.631	1.00	61.98
原子	1193	CD	GLU	150	-2.892	20.505	56.460	1.00	61.98
原子	1194	OE1	GLU	150	-2.978	19.313	56.086	1.00	61.98
原子	1195	OE2	GLU	150	-3.524	21.438	55.915	1.00	61.98

原子	1196	C	GLU	150	0.127	22.106	59.316	1.00	45.51
原子	1197	O	GLU	150	0.452	21.141	60.001	1.00	45.51
原子	1198	N	ASP	151	0.994	22.753	58.549	1.00	41.19
原子	1199	CA	ASP	151	2.392	22.340	58.486	1.00	41.19
原子	1200	CB	ASP	151	3.152	23.242	57.517	1.00	62.06
原子	1201	CG	ASP	151	2.710	23.042	56.088	1.00	62.06
原子	1202	OD1	ASP	151	3.050	23.886	55.232	1.00	62.06
原子	1203	OD2	ASP	151	2.025	22.033	55.817	1.00	62.06
原子	1204	C	ASP	151	3.096	22.322	59.845	1.00	41.19
原子	1205	O	ASP	151	3.879	21.416	60.131	1.00	41.19
原子	1206	N	ASP	152	2.825	23.316	60.683	1.00	40.51
原子	1207	CA	ASP	152	3.461	23.366	61.998	1.00	40.51
原子	1208	CB	ASP	152	3.259	24.736	62.642	1.00	57.97
原子	1209	CG	ASP	152	3.931	25.841	61.865	1.00	57.97
原子	1210	OD1	ASP	152	3.460	26.168	60.760	1.00	57.97
原子	1211	OD2	ASP	152	4.942	26.379	62.354	1.00	57.97
原子	1212	C	ASP	152	2.908	22.282	62.910	1.00	40.51
原子	1213	O	ASP	152	3.598	21.794	63.799	1.00	40.51
原子	1214	N	ALA	153	1.656	21.907	62.678	1.00	34.68
原子	1215	CA	ALA	153	1.012	20.881	63.472	1.00	34.68
原子	1216	CB	ALA	153	-0.485	20.867	63.185	1.00	29.15
原子	1217	C	ALA	153	1.633	19.532	63.130	1.00	34.68
原子	1218	O	ALA	153	1.885	18.707	64.010	1.00	34.68
原子	1219	N	LYS	154	1.895	19.314	61.848	1.00	39.97
原子	1220	CA	LYS	154	2.484	18.057	61.424	1.00	39.97
原子	1221	CB	LYS	154	2.539	17.971	59.899	1.00	79.16
原子	1222	CG	LYS	154	1.176	17.724	59.270	1.00	79.16
原子	1223	CD	LYS	154	1.238	17.768	57.753	1.00	79.16
原子	1224	CE	LYS	154	-0.150	17.675	57.135	1.00	79.16

原子	1225	NZ	LYS	154	-0.105	17.865	55.654	1.00	79.16
原子	1226	C	LYS	154	3.861	17.813	62.014	1.00	39.97
原子	1227	O	LYS	154	4.124	16.716	62.498	1.00	39.97
原子	1228	N	ARG	155	4.740	18.813	62.005	1.00	39.62
原子	1229	CA	ARG	155	6.075	18.588	62.560	1.00	39.62
原子	1230	CB	ARG	155	7.053	19.698	62.160	1.00	60.09
原子	1231	CG	ARG	155	6.945	20.956	62.975	1.00	60.09
原子	1232	CD	ARG	155	8.256	21.723	62.990	1.00	60.09
原子	1233	NE	ARG	155	8.047	23.093	63.448	1.00	60.09
原子	1234	CZ	ARG	155	7.654	23.432	64.674	1.00	60.09
原子	1235	NH1	ARG	155	7.434	22.501	65.594	1.00	60.09
原子	1236	NH2	ARG	155	7.447	24.709	64.972	1.00	60.09
原子	1237	C	ARG	155	6.028	18.462	64.081	1.00	39.62
原子	1238	O	ARG	155	6.890	17.831	64.693	1.00	39.62
原子	1239	N	LEU	156	5.014	19.067	64.686	1.00	37.71
原子	1240	CA	LEU	156	4.840	19.002	66.131	1.00	37.71
原子	1241	CB	LEU	156	3.717	19.951	66.556	1.00	41.73
原子	1242	CG	LEU	156	3.959	20.955	67.691	1.00	41.73
原子	1243	CD1	LEU	156	5.447	21.194	67.929	1.00	41.73
原子	1244	CD2	LEU	156	3.258	22.257	67.324	1.00	41.73
原子	1245	C	LEU	156	4.473	17.558	66.471	1.00	37.71
原子	1246	O	LEU	156	4.996	16.982	67.420	1.00	37.71
原子	1247	N	GLU	157	3.578	16.981	65.673	1.00	38.40
原子	1248	CA	GLU	157	3.140	15.606	65.867	1.00	38.40
原子	1249	CB	GLU	157	2.013	15.278	64.885	1.00	42.33
原子	1250	CG	GLU	157	0.741	16.056	65.182	1.00	42.33
原子	1251	CD	GLU	157	-0.137	16.281	63.961	1.00	42.33
原子	1252	OE1	GLU	157	-1.113	17.060	64.072	1.00	42.33
原子	1253	OE2	GLU	157	0.145	15.690	62.896	1.00	42.33

原子	1254	C	GLU	157	4.312	14.644	65.687	1.00	38.40
原子	1255	O	GLU	157	4.451	13.682	66.443	1.00	38.40
原子	1256	N	ASN	158	5.157	14.912	64.694	1.00	42.65
原子	1257	CA	ASN	158	6.323	14.072	64.437	1.00	42.65
原子	1258	CB	ASN	158	7.060	14.549	63.187	1.00	53.78
原子	1259	CG	ASN	158	6.273	14.298	61.923	1.00	53.78
原子	1260	OD1	ASN	158	6.565	14.868	60.868	1.00	53.78
原子	1261	ND2	ASN	158	5.268	13.432	62.016	1.00	53.78
原子	1262	C	ASN	158	7.274	14.100	65.627	1.00	42.65
原子	1263	O	ASN	158	7.824	13.068	66.021	1.00	42.65
原子	1264	N	GLU	159	7.468	15.282	66.203	1.00	41.03
原子	1265	CA	GLU	159	8.352	15.400	67.350	1.00	41.03
原子	1266	CB	GLU	159	8.517	16.865	67.760	1.00	80.12
原子	1267	CG	GLU	159	9.384	17.043	68.999	1.00	80.12
原子	1268	CD	GLU	159	10.772	16.430	68.852	1.00	80.12
原子	1269	OE1	GLU	159	11.367	16.051	69.889	1.00	80.12
原子	1270	OE2	GLU	159	11.270	16.337	67.708	1.00	80.12
原子	1271	C	GLU	159	7.803	14.579	68.516	1.00	41.03
原子	1272	O	GLU	159	8.551	13.882	69.200	1.00	41.03
原子	1273	N	ILE	160	6.496	14.656	68.737	1.00	37.16
原子	1274	CA	ILE	160	5.878	13.896	69.810	1.00	37.16
原子	1275	CB	ILE	160	4.369	14.254	69.961	1.00	41.43
原子	1276	CG2	ILE	160	3.548	13.011	70.247	1.00	41.43
原子	1277	CG1	ILE	160	4.173	15.224	71.130	1.00	41.43
原子	1278	CD1	ILE	160	4.867	16.538	70.976	1.00	41.43
原子	1279	C	ILE	160	6.040	12.413	69.502	1.00	37.16
原子	1280	O	ILE	160	6.320	11.607	70.386	1.00	37.16
原子	1281	N	GLN	161	5.875	12.056	68.236	1.00	40.44
原子	1282	CA	GLN	161	6.007	10.667	67.824	1.00	40.44

原子	1283	CB	GLN	161	5.642	10.518	66.348	1.00	47.39
原子	1284	CG	GLN	161	5.636	9.082	65.878	1.00	47.39
原子	1285	CD	GLN	161	4.721	8.211	66.716	1.00	47.39
原子	1286	OE1	GLN	161	5.116	7.136	67.178	1.00	47.39
原子	1287	NE2	GLN	161	3.489	8.667	66.914	1.00	47.39
原子	1288	C	GLN	161	7.435	10.171	68.064	1.00	40.44
原子	1289	O	GLN	161	7.643	9.034	68.498	1.00	40.44
原子	1290	N	ALA	162	8.416	11.029	67.785	1.00	32.94
原子	1291	CA	ALA	162	9.810	10.670	67.986	1.00	32.94
原子	1292	CB	ALA	162	10.719	11.759	67.434	1.00	30.93
原子	1293	C	ALA	162	10.056	10.465	69.478	1.00	32.94
原子	1294	O	ALA	162	10.733	9.511	69.876	1.00	32.94
原子	1295	N	LEU	163	9.492	11.350	70.299	1.00	31.29
原子	1296	CA	LEU	163	9.629	11.256	71.759	1.00	31.29
原子	1297	CB	LEU	163	8.952	12.438	72.446	1.00	44.08
原子	1298	CG	LEU	163	9.756	13.730	72.562	1.00	44.08
原子	1299	CD1	LEU	163	8.899	14.794	73.242	1.00	44.08
原子	1300	CD2	LEU	163	11.026	13.467	73.362	1.00	44.08
原子	1301	C	LEU	163	9.016	9.970	72.298	1.00	31.29
原子	1302	O	LEU	163	9.566	9.337	73.197	1.00	31.29
原子	1303	N	THR	164	7.867	9.601	71.746	1.00	30.16
原子	1304	CA	THR	164	7.175	8.389	72.147	1.00	30.16
原子	1305	CB	THR	164	5.812	8.280	71.431	1.00	32.81
原子	1306	OG1	THR	164	4.972	9.360	71.849	1.00	32.81
原子	1307	CG2	THR	164	5.125	6.972	71.766	1.00	32.81
原子	1308	C	THR	164	8.033	7.163	71.825	1.00	30.16
原子	1309	O	THR	164	8.212	6.290	72.674	1.00	30.16
原子	1310	N	ASP	165	8.567	7.093	70.609	1.00	36.74
原子	1311	CA	ASP	165	9.405	5.954	70.237	1.00	36.74

原子	1312	CB	ASP	165	9.809	6.009	68.764	1.00	43.20
原子	1313	CG	ASP	165	8.627	6.038	67.838	1.00	43.20
原子	1314	OD1	ASP	165	7.598	5.410	68.157	1.00	43.20
原子	1315	OD2	ASP	165	8.733	6.683	66.781	1.00	43.20
原子	1316	C	ASP	165	10.669	5.957	71.081	1.00	36.74
原子	1317	O	ASP	165	11.175	4.910	71.468	1.00	36.74
原子	1318	N	GLU	166	11.180	7.148	71.360	1.00	35.71
原子	1319	CA	GLU	166	12.379	7.271	72.159	1.00	35.71
原子	1320	CB	GLU	166	12.782	8.744	72.247	1.00	54.57
原子	1321	CG	GLU	166	13.811	9.057	73.318	1.00	54.57
原子	1322	CD	GLU	166	14.165	10.542	73.381	1.00	54.57
原子	1323	OE1	GLU	166	14.607	11.010	74.458	1.00	54.57
原子	1324	OE2	GLU	166	14.010	11.233	72.346	1.00	54.57
原子	1325	C	GLU	166	12.131	6.678	73.549	1.00	35.71
原子	1326	O	GLU	166	12.978	5.958	74.083	1.00	35.71
原子	1327	N	PHE	167	10.966	6.957	74.128	1.00	32.84
原子	1328	CA	PHE	167	10.664	6.437	75.455	1.00	32.84
原子	1329	CB	PHE	167	9.675	7.349	76.181	1.00	33.04
原子	1330	CG	PHE	167	10.337	8.524	76.824	1.00	33.04
原子	1331	CD1	PHE	167	10.602	9.677	76.093	1.00	33.04
原子	1332	CD2	PHE	167	10.806	8.435	78.127	1.00	33.04
原子	1333	CE1	PHE	167	11.330	10.732	76.650	1.00	33.04
原子	1334	CE2	PHE	167	11.536	9.483	78.695	1.00	33.04
原子	1335	CZ	PHE	167	11.802	10.633	77.949	1.00	33.04
原子	1336	C	PHE	167	10.205	4.992	75.492	1.00	32.84
原子	1337	O	PHE	167	10.456	4.295	76.471	1.00	32.84
原子	1338	N	ILE	168	9.534	4.536	74.439	1.00	29.66
原子	1339	CA	ILE	168	9.129	3.141	74.378	1.00	29.66
原子	1340	CB	ILE	168	8.321	2.835	73.090	1.00	23.21

原子	1341	CG2	ILE	168	8.154	1.336	72.914	1.00	23.21
原子	1342	CG1	ILE	168	6.956	3.527	73.151	1.00	23.21
原子	1343	CD1	ILE	168	6.045	3.006	74.261	1.00	23.21
原子	1344	C	ILE	168	10.441	2.357	74.333	1.00	29.66
原子	1345	O	ILE	168	10.576	1.314	74.963	1.00	29.66
原子	1346	N	GLU	169	11.409	2.876	73.584	1.00	31.65
原子	1347	CA	GLU	169	12.714	2.233	73.460	1.00	31.65
原子	1348	CB	GLU	169	13.622	3.015	72.512	1.00	93.52
原子	1349	CG	GLU	169	13.972	2.279	71.237	1.00	93.52
原子	1350	CD	GLU	169	15.263	2.784	70.617	1.00	93.52
原子	1351	OE1	GLU	169	16.259	2.029	70.623	1.00	93.52
原子	1352	OE2	GLU	169	15.287	3.936	70.133	1.00	93.52
原子	1353	C	GLU	169	13.399	2.133	74.811	1.00	31.65
原子	1354	O	GLU	169	13.927	1.084	75.166	1.00	31.65
原子	1355	N	LYS	170	13.397	3.233	75.557	1.00	29.27
原子	1356	CA	LYS	170	14.020	3.262	76.869	1.00	29.27
原子	1357	CB	LYS	170	13.933	4.665	77.479	1.00	37.44
原子	1358	CG	LYS	170	14.604	5.778	76.681	1.00	37.44
原子	1359	CD	LYS	170	14.878	6.964	77.592	1.00	37.44
原子	1360	CE	LYS	170	15.005	8.291	76.849	1.00	37.44
原子	1361	NZ	LYS	170	16.177	8.363	75.931	1.00	37.44
原子	1362	C	LYS	170	13.345	2.258	77.799	1.00	29.27
原子	1363	O	LYS	170	13.999	1.647	78.646	1.00	29.27
原子	1364	N	LEU	171	12.034	2.090	77.651	1.00	41.19
原子	1365	CA	LEU	171	11.309	1.134	78.481	1.00	41.19
原子	1366	CB	LEU	171	9.802	1.224	78.237	1.00	27.02
原子	1367	CG	LEU	171	8.903	1.952	79.251	1.00	27.02
原子	1368	CD1	LEU	171	9.643	2.164	80.555	1.00	27.02
原子	1369	CD2	LEU	171	8.446	3.275	78.696	1.00	27.02

原子	1370	C	LEU	171	11.789	-0.271	78.153	1.00	41.19
原子	1371	O	LEU	171	12.092	-1.059	79.048	1.00	41.19
原子	1372	N	ASP	172	11.872	-0.577	76.863	1.00	35.05
原子	1373	CA	ASP	172	12.321	-1.890	76.435	1.00	35.05
原子	1374	CB	ASP	172	12.324	-2.001	74.907	1.00	41.75
原子	1375	CG	ASP	172	10.923	-2.075	74.324	1.00	41.75
原子	1376	OD1	ASP	172	10.790	-2.135	73.080	1.00	41.75
原子	1377	OD2	ASP	172	9.954	-2.077	75.111	1.00	41.75
原子	1378	C	ASP	172	13.711	-2.152	76.962	1.00	35.05
原子	1379	O	ASP	172	14.037	-3.283	77.336	1.00	35.05
原子	1380	N	GLU	173	14.533	-1.110	77.003	1.00	32.93
原子	1381	CA	GLU	173	15.892	-1.278	77.491	1.00	32.93
原子	1382	CB	GLU	173	16.706	-0.007	77.306	1.00	41.86
原子	1383	CG	GLU	173	18.142	-0.213	77.734	1.00	41.86
原子	1384	CD	GLU	173	18.999	1.008	77.563	1.00	41.86
原子	1385	OE1	GLU	173	18.671	1.847	76.688	1.00	41.86
原子	1386	OE2	GLU	173	20.009	1.112	78.294	1.00	41.86
原子	1387	C	GLU	173	15.873	-1.630	78.965	1.00	32.93
原子	1388	O	GLU	173	16.495	-2.601	79.400	1.00	32.93
原子	1389	N	VAL	174	15.160	-0.811	79.726	1.00	31.38
原子	1390	CA	VAL	174	15.023	-0.990	81.156	1.00	31.38
原子	1391	CB	VAL	174	14.087	0.108	81.715	1.00	34.37
原子	1392	CG1	VAL	174	13.572	-0.277	83.053	1.00	34.37
原子	1393	CG2	VAL	174	14.846	1.426	81.815	1.00	34.37
原子	1394	C	VAL	174	14.506	-2.401	81.488	1.00	31.38
原子	1395	O	VAL	174	14.896	-2.997	82.492	1.00	31.38
原子	1396	N	PHE	175	13.631	-2.943	80.648	1.00	32.64
原子	1397	CA	PHE	175	13.136	-4.290	80.895	1.00	32.64
原子	1398	CB	PHE	175	11.999	-4.661	79.947	1.00	30.70

原子	1399	CG	PHE	175	11.718	-6.133	79.920	1.00	30.70
原子	1400	CD1	PHE	175	11.187	-6.770	81.038	1.00	30.70
原子	1401	CD2	PHE	175	12.056	-6.898	78.810	1.00	30.70
原子	1402	CE1	PHE	175	11.001	-8.159	81.056	1.00	30.70
原子	1403	CE2	PHE	175	11.878	-8.280	78.811	1.00	30.70
原子	1404	CZ	PHE	175	11.348	-8.916	79.938	1.00	30.70
原子	1405	C	PHE	175	14.262	-5.296	80.695	1.00	32.64
原子	1406	O	PHE	175	14.444	-6.196	81.509	1.00	32.64
原子	1407	N	GLU	176	15.002	-5.150	79.597	1.00	36.36
原子	1408	CA	GLU	176	16.120	-6.039	79.290	1.00	36.36
原子	1409	CB	GLU	176	16.826	-5.595	78.011	1.00	49.35
原子	1410	CG	GLU	176	16.862	-6.649	76.921	1.00	49.35
原子	1411	CD	GLU	176	17.554	-7.935	77.348	1.00	49.35
原子	1412	OE1	GLU	176	18.722	-7.869	77.793	1.00	49.35
原子	1413	OE2	GLU	176	16.929	-9.015	77.232	1.00	49.35
原子	1414	C	GLU	176	17.125	-6.050	80.428	1.00	36.36
原子	1415	O	GLU	176	17.603	-7.110	80.832	1.00	36.36
原子	1416	N	ILE	177	17.444	-4.866	80.942	1.00	35.83
原子	1417	CA	ILE	177	18.398	-4.740	82.033	1.00	35.83
原子	1418	CB	ILE	177	18.606	-3.259	82.422	1.00	29.26
原子	1419	CG2	ILE	177	19.370	-3.163	83.737	1.00	29.26
原子	1420	CG1	ILE	177	19.358	-2.525	81.303	1.00	29.26
原子	1421	CD1	ILE	177	20.851	-2.863	81.233	1.00	29.26
原子	1422	C	ILE	177	17.936	-5.513	83.265	1.00	35.83
原子	1423	O	ILE	177	18.738	-6.162	83.946	1.00	35.83
原子	1424	N	LYS	178	16.643	-5.448	83.554	1.00	34.13
原子	1425	CA	LYS	178	16.112	-6.147	84.707	1.00	34.13
原子	1426	CB	LYS	178	14.687	-5.684	85.003	1.00	28.12
原子	1427	CG	LYS	178	14.188	-6.109	86.376	1.00	28.12

原子	1428	CD	LYS	178	15.059	-5.482	87.469	1.00	28.12
原子	1429	CE	LYS	178	14.588	-5.848	88.857	1.00	28.12
原子	1430	NZ	LYS	178	15.375	-5.118	89.878	1.00	28.12
原子	1431	C	LYS	178	16.117	-7.645	84.444	1.00	34.13
原子	1432	O	LYS	178	16.470	-8.440	85.325	1.00	34.13
原子	1433	N	LYS	179	15.719	-8.028	83.232	1.00	34.54
原子	1434	CA	LYS	179	15.682	-9.435	82.865	1.00	34.54
原子	1435	CB	LYS	179	15.233	-9.610	81.419	1.00	32.56
原子	1436	CG	LYS	179	15.201	-11.056	80.963	1.00	32.56
原子	1437	CD	LYS	179	14.889	-11.124	79.487	1.00	32.56
原子	1438	CE	LYS	179	14.908	-12.551	78.949	1.00	32.56
原子	1439	NZ	LYS	179	14.654	-12.572	77.478	1.00	32.56
原子	1440	C	LYS	179	17.064	-10.035	83.044	1.00	34.54
原子	1441	O	LYS	179	17.202	-11.146	83.554	1.00	34.54
原子	1442	N	GLU	180	18.085	-9.297	82.623	1.00	32.37
原子	1443	CA	GLU	180	19.455	-9.765	82.765	1.00	32.37
原子	1444	CB	GLU	180	20.427	-8.792	82.106	1.00	44.31
原子	1445	CG	GLU	180	20.288	-8.756	80.608	1.00	44.31
原子	1446	CD	GLU	180	21.035	-7.609	79.980	1.00	44.31
原子	1447	OE1	GLU	180	20.809	-7.366	78.779	1.00	44.31
原子	1448	OE2	GLU	180	21.841	-6.951	80.677	1.00	44.31
原子	1449	C	GLU	180	19.793	-9.908	84.232	1.00	32.37
原子	1450	O	GLU	180	20.371	-10.898	84.635	1.00	32.37
原子	1451	N	GLU	181	19.422	-8.920	85.035	1.00	35.90
原子	1452	CA	GLU	181	19.708	-8.966	86.465	1.00	35.90
原子	1453	CB	GLU	181	19.124	-7.738	87.160	1.00	47.46
原子	1454	CG	GLU	181	19.444	-7.662	88.642	1.00	47.46
原子	1455	CD	GLU	181	18.738	-6.511	89.342	1.00	47.46
原子	1456	OE1	GLU	181	17.501	-6.522	89.412	1.00	47.46

原子	1457	OE2	GLU	181	19.419	-5.589	89.823	1.00	47.46
原子	1458	C	GLU	181	19.125	-10.230	87.096	1.00	35.90
原子	1459	O	GLU	181	19.771	-10.892	87.910	1.00	35.90
原子	1460	N	ILE	182	17.899	-10.555	86.709	1.00	38.32
原子	1461	CA	ILE	182	17.210	-11.717	87.243	1.00	38.32
原子	1462	CB	ILE	182	15.724	-11.673	86.870	1.00	31.34
原子	1463	CG2	ILE	182	15.056	-13.010	87.194	1.00	31.34
原子	1464	CG1	ILE	182	15.051	-10.513	87.595	1.00	31.34
原子	1465	CD1	ILE	182	13.680	-10.173	87.047	1.00	31.34
原子	1466	C	ILE	182	17.798	-13.040	86.773	1.00	38.32
原子	1467	O	ILE	182	17.841	-13.997	87.541	1.00	38.32
原子	1468	N	MET	183	18.249	-13.094	85.520	1.00	47.57
原子	1469	CA	MET	183	18.819	-14.318	84.957	1.00	47.57
原子	1470	CB	MET	183	18.614	-14.370	83.444	1.00	45.73
原子	1471	CG	MET	183	17.174	-14.221	82.994	1.00	45.73
原子	1472	SD	MET	183	16.076	-15.382	83.795	1.00	45.73
原子	1473	CE	MET	183	16.837	-16.936	83.323	1.00	45.73
原子	1474	C	MET	183	20.299	-14.434	85.261	1.00	47.57
原子	1475	O	MET	183	20.777	-15.516	85.583	1.00	47.57
原子	1476	N	GLU	184	21.026	-13.325	85.128	1.00	64.62
原子	1477	CA	GLU	184	22.455	-13.295	85.437	1.00	64.62
原子	1478	CB	GLU	184	23.104	-12.016	84.885	1.00	100.23
原子	1479	CG	GLU	184	22.781	-11.669	83.422	1.00	100.23
原子	1480	CD	GLU	184	23.213	-12.733	82.429	1.00	100.23
原子	1481	OE1	GLU	184	24.282	-13.344	82.642	1.00	100.23
原子	1482	OE2	GLU	184	22.490	-12.945	81.426	1.00	100.23
原子	1483	C	GLU	184	22.528	-13.313	86.974	1.00	64.62
原子	1484	O	GLU	184	23.295	-12.582	87.596	1.00	64.62
原子	1485	N	PHE	185	21.677	-14.170	87.538	1.00	64.82

原子	1486	CA	PHE	185	21.470	-14.427	88.968	1.00	64.82
原子	1487	CB	PHE	185	21.845	-15.885	89.308	1.00	100.63
原子	1488	CG	PHE	185	23.303	-16.226	89.133	1.00	100.63
原子	1489	CD1	PHE	185	24.222	-15.967	90.146	1.00	100.63
原子	1490	CD2	PHE	185	23.744	-16.877	87.984	1.00	100.63
原子	1491	CE1	PHE	185	25.554	-16.363	90.018	1.00	100.63
原子	1492	CE2	PHE	185	25.074	-17.272	87.854	1.00	100.63
原子	1493	CZ	PHE	185	25.975	-17.015	88.872	1.00	100.63
原子	1494	C	PHE	185	22.019	-13.492	90.040	1.00	64.82
原子	1495	O	PHE	185	21.202	-13.108	90.910	1.00	64.82
原子	1496	OT	PHE	185	23.222	-13.161	90.023	1.00	100.63
原子	1497	OH2	WAT	1	7.314	-7.392	118.599	1.00	28.51
原子	1498	OH2	WAT	2	20.141	-10.167	116.646	1.00	41.71
原子	1499	OH2	WAT	3	-0.839	7.103	71.695	1.00	38.40
原子	1500	OH2	WAT	4	20.724	-12.318	113.141	1.00	36.06
原子	1501	OH2	WAT	5	13.214	7.193	109.995	1.00	34.42
原子	1502	OH2	WAT	6	-4.563	25.067	61.299	1.00	35.61
原子	1503	OH2	WAT	7	9.162	-10.160	92.783	1.00	40.02
原子	1504	OH2	WAT	8	15.821	7.078	82.761	1.00	45.31
原子	1505	OH2	WAT	9	15.568	0.183	88.102	1.00	24.68
原子	1506	OH2	WAT	10	17.031	-3.108	93.557	1.00	33.93
原子	1507	OH2	WAT	11	-5.066	12.003	70.605	1.00	31.32
原子	1508	OH2	WAT	12	17.672	-16.020	114.048	1.00	36.87
原子	1509	OH2	WAT	13	7.862	-1.817	71.942	1.00	33.70
原子	1510	OH2	WAT	14	8.138	-13.701	94.980	1.00	33.33
原子	1511	OH2	WAT	15	11.279	0.783	115.697	1.00	32.56
原子	1512	OH2	WAT	16	16.003	6.468	88.212	1.00	29.59
原子	1513	OH2	WAT	17	8.553	-16.970	109.277	1.00	43.42
原子	1514	OH2	WAT	18	18.461	-2.485	119.281	1.00	42.15

原子	1515	OH2 WAT	19	6.746	-17.081	107.102	1.00	37.19
原子	1516	OH2 WAT	20	2.389	-1.792	87.493	1.00	33.97
原子	1517	OH2 WAT	21	16.366	-2.230	89.109	1.00	26.69
原子	1518	OH2 WAT	22	5.158	-12.795	87.845	1.00	43.81
原子	1519	OH2 WAT	23	5.761	7.139	104.779	1.00	36.64
原子	1520	OH2 WAT	24	10.078	-21.141	83.981	1.00	45.96
原子	1521	OH2 WAT	25	1.702	29.020	57.574	1.00	39.21
原子	1522	OH2 WAT	26	21.863	-2.142	99.878	1.00	44.34
原子	1523	OH2 WAT	27	17.198	13.784	85.530	1.00	51.52
原子	1524	OH2 WAT	28	-0.400	2.402	82.821	1.00	35.70
原子	1525	OH2 WAT	29	13.686	5.872	89.473	1.00	44.84
原子	1526	OH2 WAT	30	17.457	-13.476	113.108	1.00	33.62
原子	1527	OH2 WAT	31	16.228	-0.207	73.422	1.00	40.99
原子	1528	OH2 WAT	32	19.350	1.763	107.228	1.00	41.09
原子	1529	OH2 WAT	33	21.908	-12.207	93.466	1.00	47.34
原子	1530	OH2 WAT	34	2.605	-3.562	103.490	1.00	38.48
原子	1531	OH2 WAT	35	-2.900	25.786	57.810	1.00	32.08
原子	1532	OH2 WAT	36	9.098	-15.151	82.349	1.00	38.27
原子	1533	OH2 WAT	37	-12.293	25.412	66.878	1.00	41.13
原子	1534	OH2 WAT	38	15.500	-8.451	95.623	1.00	36.30
原子	1535	OH2 WAT	39	-2.144	0.572	109.124	1.00	41.18
原子	1536	OH2 WAT	40	1.366	0.844	117.806	1.00	43.55
原子	1537	OH2 WAT	41	-3.862	8.488	66.607	1.00	42.64
原子	1538	OH2 WAT	42	14.848	-25.238	90.334	1.00	44.95
原子	1539	OH2 WAT	43	21.959	-4.948	118.899	1.00	44.58
原子	1540	OH2 WAT	44	8.447	-16.493	95.999	1.00	57.34
原子	1541	OH2 WAT	45	-3.320	18.594	80.730	1.00	44.65
原子	1542	OH2 WAT	46	4.042	3.465	70.117	1.00	42.29
原子	1543	OH2 WAT	47	0.370	-3.250	110.892	1.00	34.03

原子	1544	OH2	WAT	48	1.694	-13.510	110.447	1.00	43.12
原子	1545	OH2	WAT	49	16.216	-2.085	84.867	1.00	29.17
原子	1546	OH2	WAT	50	15.797	-7.322	122.289	1.00	49.41
原子	1547	OH2	WAT	51	18.922	-12.474	79.878	1.00	42.31
原子	1548	OH2	WAT	52	-5.107	22.838	73.181	1.00	38.51
原子	1549	OH2	WAT	53	14.563	4.864	98.821	1.00	32.28
原子	1550	OH2	WAT	54	13.994	-16.023	105.563	1.00	44.24
原子	1551	OH2	WAT	55	-4.133	13.720	66.033	1.00	53.29
原子	1552	OH2	WAT	56	10.183	28.544	75.646	1.00	56.33
原子	1553	OH2	WAT	57	-3.774	-9.836	113.284	1.00	59.77
原子	1554	OH2	WAT	58	17.629	0.775	96.137	1.00	37.95
原子	1555	OH2	WAT	59	6.043	1.046	121.396	1.00	35.94
原子	1556	OH2	WAT	60	4.946	-12.576	116.234	1.00	49.56
原子	1557	OH2	WAT	61	-4.890	3.540	80.417	1.00	46.86
原子	1558	OH2	WAT	62	-1.025	-13.655	106.259	1.00	39.99
原子	1559	OH2	WAT	63	10.494	2.348	70.136	1.00	40.25
原子	1560	OH2	WAT	64	0.561	-14.185	101.707	1.00	47.94
原子	1561	OH2	WAT	65	4.913	-11.710	91.331	1.00	52.16
原子	1562	OH2	WAT	66	3.448	29.483	61.850	1.00	33.98
原子	1563	OH2	WAT	67	2.424	5.726	69.262	1.00	57.07
原子	1564	OH2	WAT	68	24.893	-19.561	96.089	1.00	55.67
原子	1565	OH2	WAT	69	-0.538	31.270	63.339	1.00	29.89
原子	1566	OH2	WAT	70	-4.671	6.956	69.710	1.00	49.13
原子	1567	OH2	WAT	71	16.579	2.427	107.056	1.00	41.13
原子	1568	OH2	WAT	72	16.449	-0.978	120.834	1.00	51.89
原子	1569	OH2	WAT	73	3.860	-5.877	90.214	1.00	44.03

請求の範囲

1. RRFタンパクの活性部位、補助的結合部位又はポケットと結合し得る化合物を設計する方法であって、RRFタンパク結晶から得られる構造座標に基づき、その化学的実体をコンピューター評価してなる、前記方法。
2. RRFタンパク結晶が、RRFタンパク自体の結晶、RRFタンパク変異体の結晶、RRFタンパクホモログの結晶及びRRFタンパクの共複合体の結晶のいずれかである、請求項1に記載の方法。
3. RRFタンパク結晶が、bipyramid系である、請求項1又は2に記載の方法。
4. RRFタンパク結晶が、空間群 $P4_12_12_1$ 又は空間群 $P4_32_12$ を有する、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
5. RRFタンパク結晶が、 $0.3 \times 0.3 \times 0.5 \text{ mm}$ の大きさを有する、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
6. RRFタンパク結晶が、 $a=b=47.3 \text{ \AA}$ 、 $c=297.6 \text{ \AA}$ の大きさの各単位格子を有する、請求項1～5のいずれかに記載の方法。
7. RRFタンパク結晶が、表7による構造座標により特徴づけられる、請求項1～6のいずれかに記載の方法。
8. RRFタンパク結晶が、*Thermotoga Maritima*由来のものである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。
9. RRFタンパク結晶が、斜方晶系である、請求項1又は2に記載の方法。
10. RRFタンパク結晶が、空間群 $P2_12_12$ を有する、請求項1、2及び9のいずれかに記載の方法。
11. RRFタンパク結晶が、 $30 \times 50 \times 250 \mu\text{m}$ の大きさを有する、請求項1～2及び9～10のいずれかに記載の方法。
12. RRFタンパク結晶が、菌X由来のものである、請求項1～2及び9～11のいずれかに記載の方法。
13. RRFタンパク結晶が、滴状蒸気拡散法により結晶化されている、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

14. RRFタンパク結晶が重原子誘導体であって、該結晶がRRFタンパク自体の結晶、RRFタンパク変異体の結晶、RRFタンパクホモログの結晶及びRRFタンパクの共複合体の結晶のいずれかである、請求項1～13のいずれかに記載の方法。

15. 重原子誘導体が、チロメサル、チオリンゴ酸金、酢酸ウラニル及び塩化鉛からなる群より選択される化合物との反応により形成されている、請求項1～14のいずれかに記載の方法。

16. RRFタンパク結晶が、白金又は水銀による重原子誘導体である、請求項1、2及び9～12のいずれかに記載の方法。

17. RRFタンパクがモノマーである、請求項1～16のいずれかに記載の方法。

18. RRFタンパクが、表5又は表6によるアミノ酸変位により特徴づけられる、請求項1～8、13～15及び17のいずれかに記載の方法。

19. 活性部位、補助的結合部位又はポケットに結合する化学的実体により特徴づけられる化合物が、RRFタンパクの阻害物質であることを特徴とする、請求項1～18のいずれかに記載の方法。

20. 前記阻害物質がRRFの競合的、非競合的又は不競合的阻害物質であることを特徴とする、請求項1～19のいずれかに記載の方法。

21. RRFタンパクの活性部位又は補助的結合部位におけるリガンドの配向を決定することを含む、請求項1～20のいずれかに記載の方法。

22. 構造座標が表7による、RRFタンパクの構造座標であることを特徴とする、請求項1～8、13～15及び17～21のいずれかに記載の方法。

23. RRFタンパクの変異体、ホモログ又は共複合体の結晶形態を分子置換により解明することを含む、RRFタンパクの3次元構造を決定する方法。

24. 斜方晶系のRRFタンパク結晶。

25. 空間群 $P2_12_12$ を有する、請求項24に記載のRRFタンパク結晶。

26. $30 \times 50 \times 250 \mu m$ の大きさを有する、請求項24又は25に記載のRRFタンパク結晶。

27. RRFが菌X由来のものである、請求項24～26のいずれかに記載のRRFタ

ンパク結晶。

28. bipyr amid系である、RRFタンパク結晶。

29. 空間群 $P4_12_12_1$ 又は空間群 $P4_32_12$ を有する、請求項28に記載のRRFタンパク結晶。

30. $0.3 \times 0.3 \times 0.5$ mmの大きさを有する、請求項28又は29に記載のRRFタンパク結晶。

31. $a=b=47.3 \text{ \AA}$ 、 $c=297.6 \text{ \AA}$ の大きさの各単位格子を有する、請求項28～30のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

32. 表5又は表6によるアミノ酸変位により特徴づけられる、請求項28～31のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

33. 表7による構造座標により特徴づけられる、請求項28～32のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

34. *Thermotoga Maritima*由来のものである、請求項28～33のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

35. 滴状蒸気拡散法により結晶化された、請求項24～34のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

36. 結晶がRRFタンパク自体の結晶、RRFタンパク変異体の結晶、RRFタンパクホモログの結晶及びRRFタンパクの共複合体の結晶のいずれかである、請求項24～35のいずれかに記載のRRFタンパク結晶。

37. 活性部位のアミノ酸が、配列番号1のArg 110、Arg 129及びArg 132からなる群から選択される、RRFタンパク。

38. 活性部位又は補助的活性部位中の1つ以上のアミノ酸が、天然に存在するアミノ酸、非天然アミノ酸、セレノシステイン及びセレノメチオニンからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸により置換されている、請求項37に記載のRRFタンパク。

39. 活性部位又は補助的活性部位中の親水性アミノ酸及び疎水性アミノ酸が置換されている、請求項37に記載のRRFタンパク。

40. 少なくとも1つのシステインアミノ酸が、セレノシステイン又はセレノメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸により置換されている、請

求項37に記載のRRFタンパク。

41. 少なくとも1つのメチオニンアミノ酸が、セレノシステイン又はセレノメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸により置換されている、請求項37に記載のRRFタンパク。

42. 結晶形態である、請求項37～38のいずれかに記載のRRFタンパク。

43. 野生型酵素より高いか、又は低い比活性を有する、請求項37に記載のRRFタンパク。

44. 変化した基質特異性を有する、請求項37に記載のRRFタンパク。

45. 化合物とRRFタンパクとの結合相互作用を測定するための、請求項37に記載のRRFタンパクの使用。

46. RRFタンパクの表面上、表面又はその近傍の少なくとも1個のアミノ酸残基が置換されており、表面荷電の1以上の荷電単位の変化が生じている、請求項37に記載のRRFタンパク。

47. RRFタンパクのポケットが、RRFタンパクの二つのドメインを隔てる折れ曲がり部分に位置するC末端近傍のポケットである請求項1～22のいずれかに記載の方法。

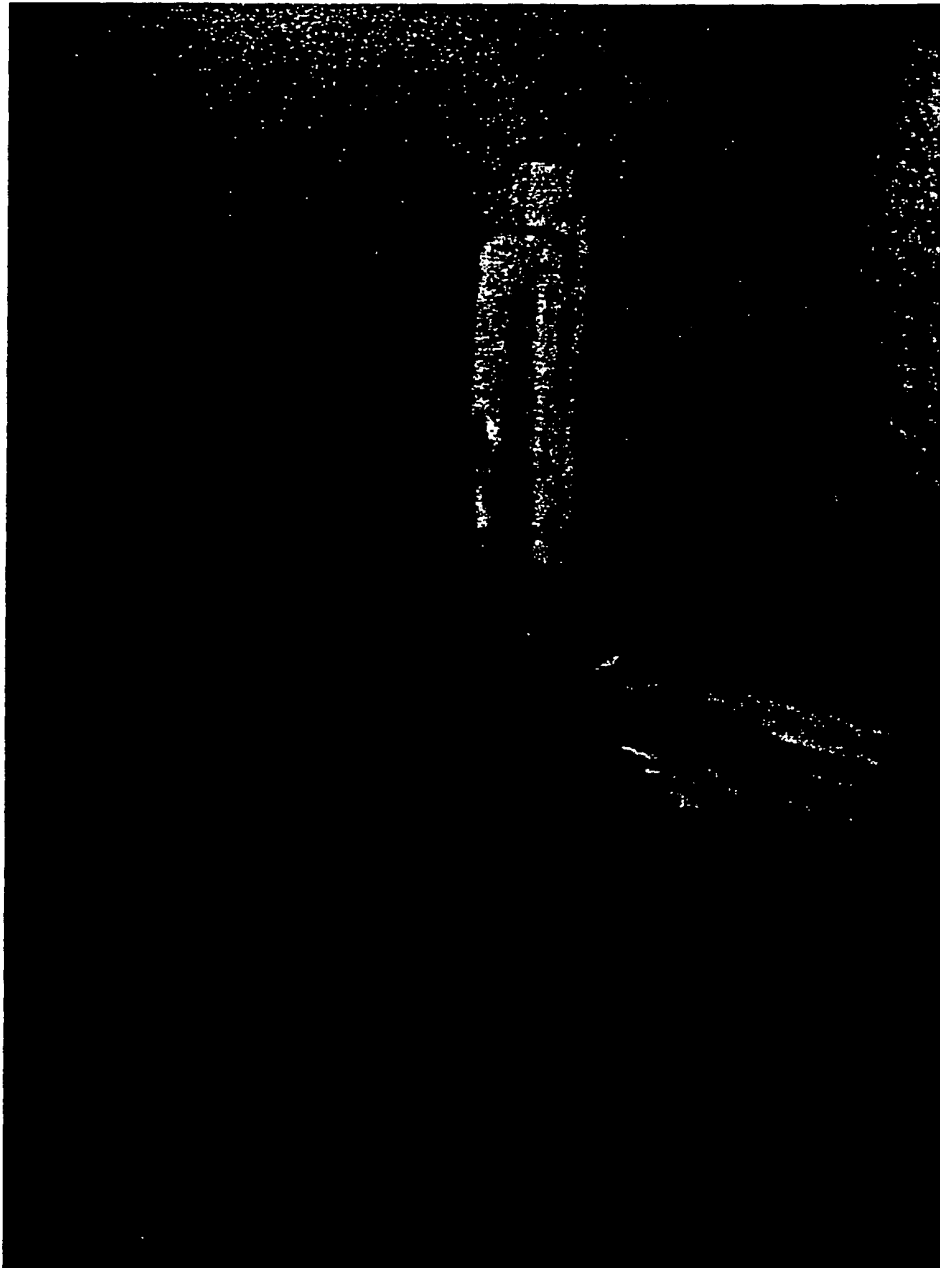
48. 上記化合物が、RRFタンパクのリボソームへの結合を阻害し、又はRRFタンパクのリボソーム上での挙動を阻害する請求項1～22のいずれかに記載の方法。

49. 請求項19～23、47、48のいずれかに記載の方法により得られる、RRFタンパクの阻害物質。

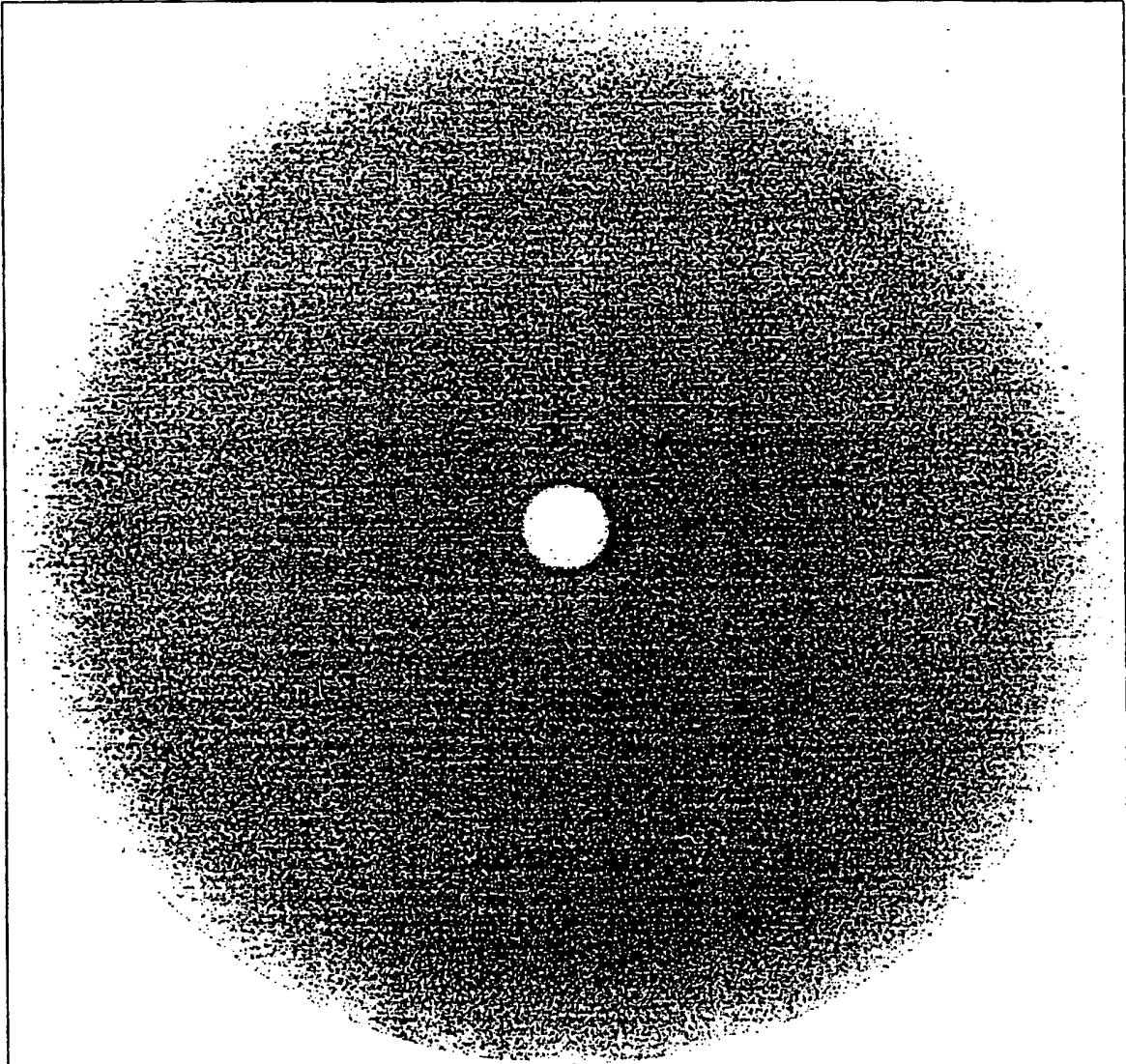
50. RRFタンパクのリボソームへの結合を阻害する活性又はRRFタンパクのリボソーム上での挙動を阻害する活性に基づいて、RRFタンパクの活性を阻害し得る化合物を探索する方法。

51. 請求項50に記載の方法により得られる、RRFタンパクの阻害物質。

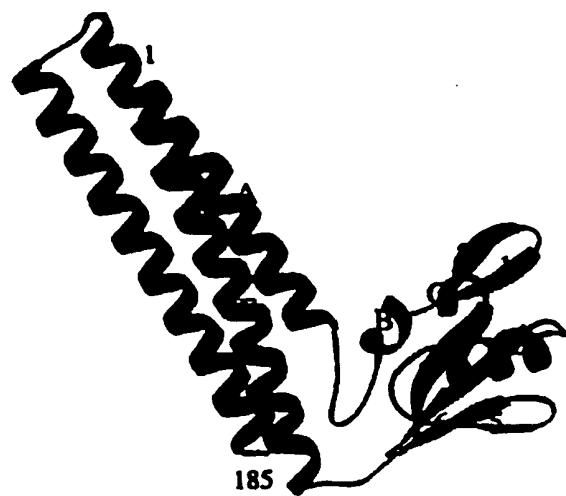
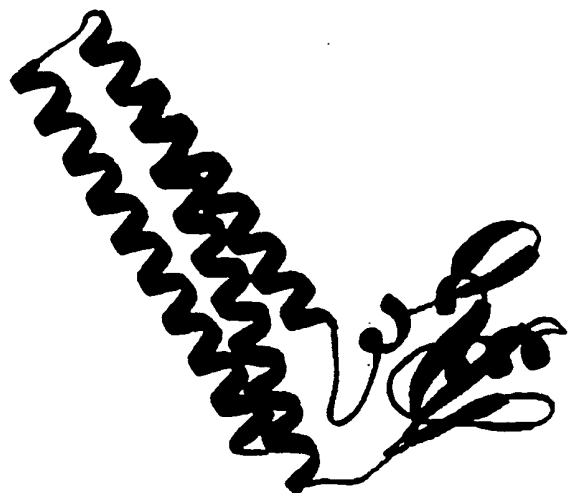
Fig. 1



F i g . 2



F i g . 3



F i g . 4

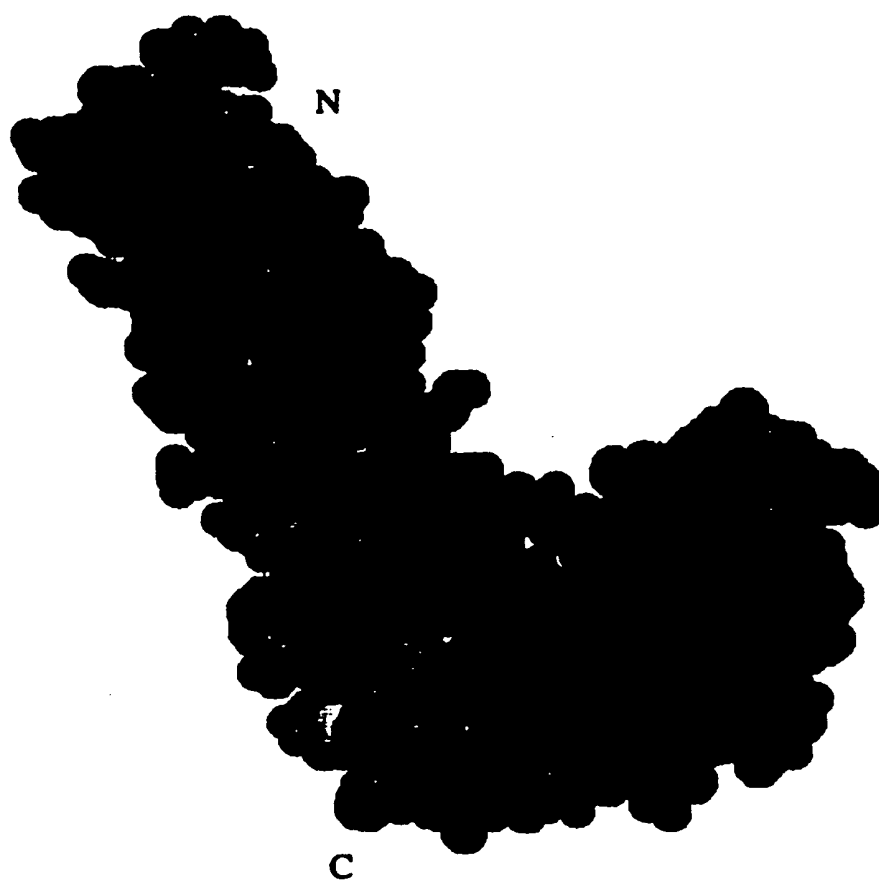


Fig. 5

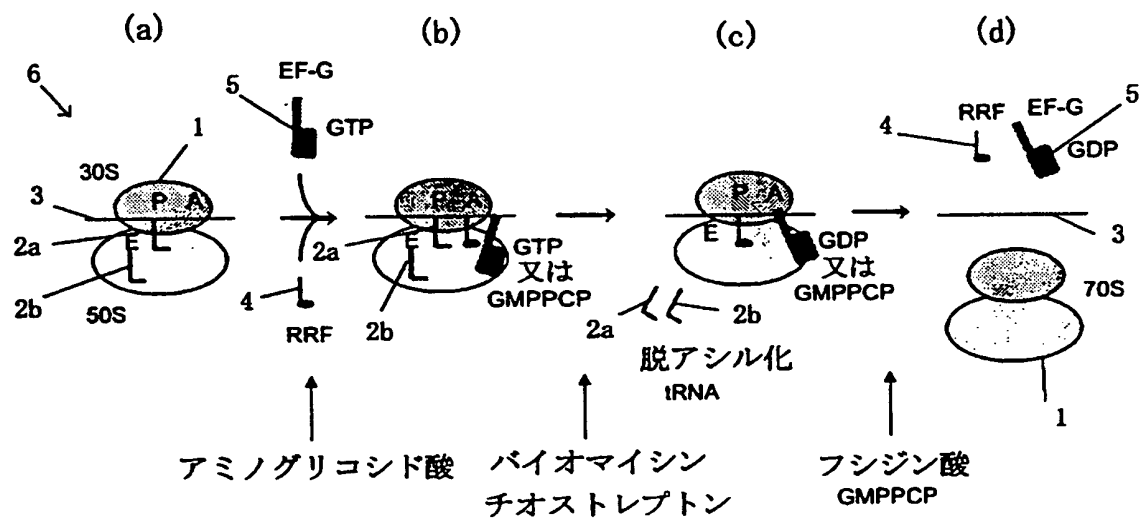


Fig. 6

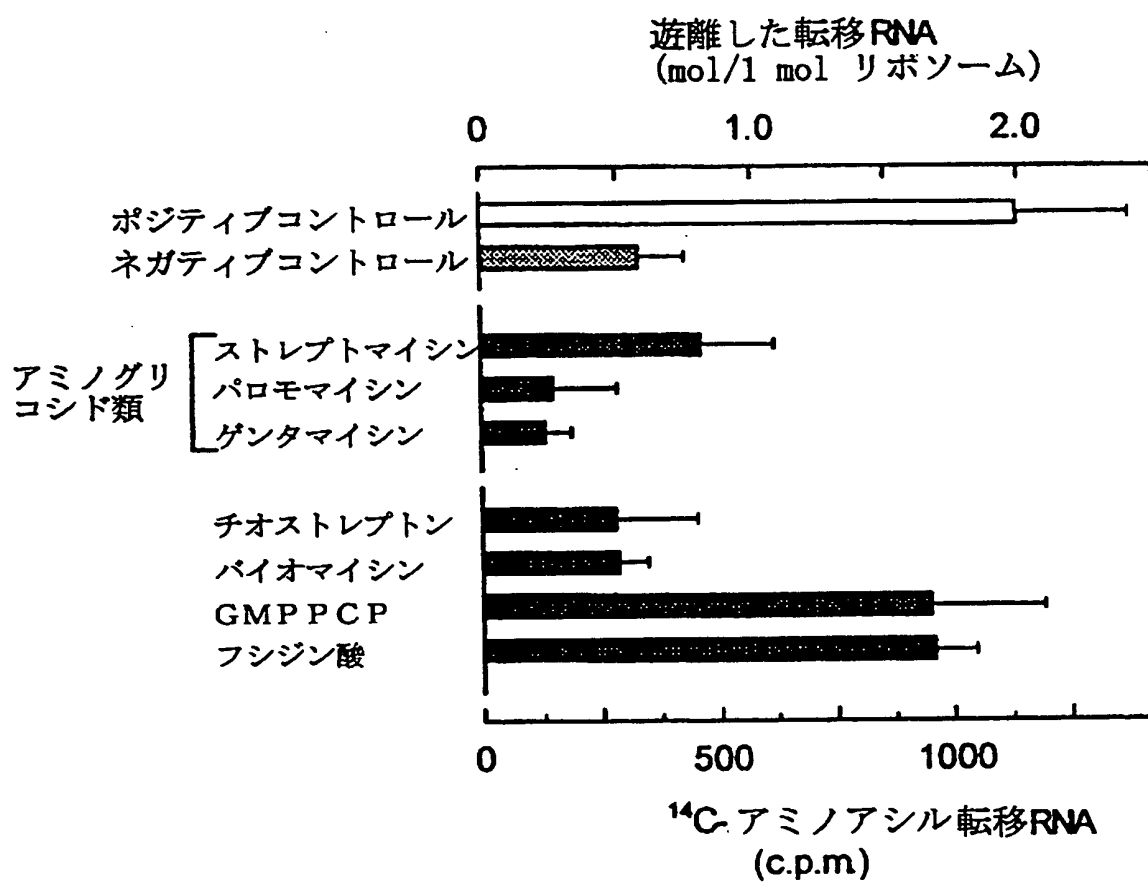


Fig. 7

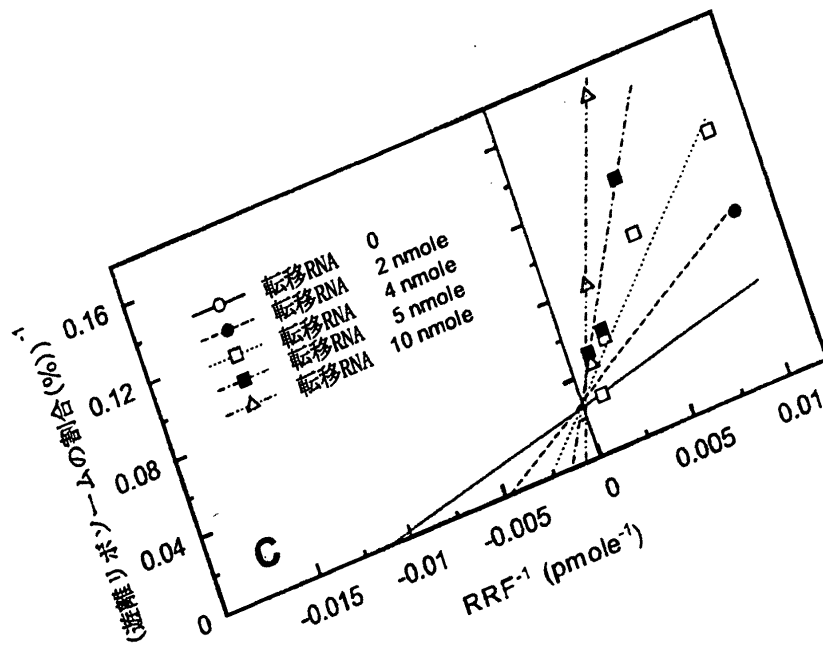
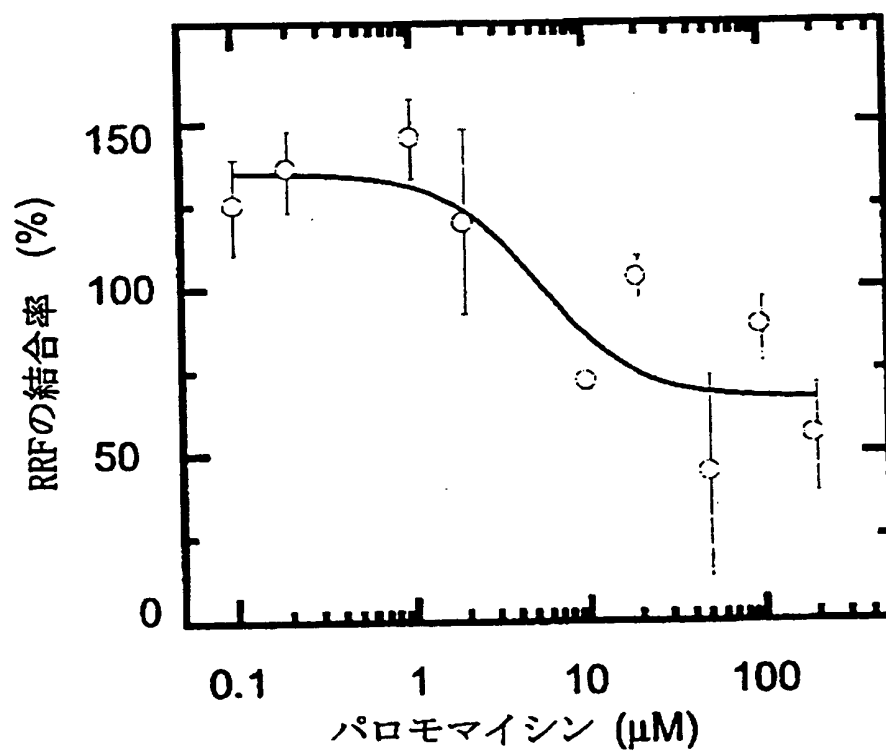


Fig. 8



[配列表]

〈110〉 出願人氏名又は名称：梶 昭(KAJI Akira)

〈120〉 発明の名称：リボソームリサイクリング因子 (RRF) タンパクの結晶及び該結晶から得られる三次元構造情報に基づく応用

〈130〉 整理番号：PCT-1741/KJ

〈160〉 配列の総数：1

〈170〉 ソフトウェア：パテントイン バージョン2.0

〈210〉 配列番号1

〈211〉 配列の長さ：185アミノ酸

〈212〉 配列の型：PRT

〈213〉 生物名：Thermotoga Maritima

〈400〉 配列：配列番号1

Met Val Asn Pro Phe Ile Lys Glu Ala Lys Glu Lys Met Lys Arg Thr

1 5 10 15

Leu Glu Lys Ile Glu Asp Glu Leu Arg Lys Met Arg Thr Gly Lys Pro

20 25 30

Ser Pro Ala Ile Leu Glu Glu Ile Lys Val Asp Tyr Tyr Gly Val Pro

35 40 45

Thr Pro Val Asn Gln Leu Ala Thr Ile Ser Ile Ser Glu Glu Arg Thr

50 55 60

Leu Val Ile Lys Pro Trp Asp Lys Ser Val Leu Ser Leu Ile Glu Lys

65 70 75 80

Ala Ile Asn Ala Ser Asp Leu Gly Leu Asn Pro Ile Asn Asp Gly Asn

85 90 95

Val Ile Arg Leu Val Phe Pro Ser Pro Thr Thr Glu Gln Arg Glu Lys

100 105 110

Trp Val Lys Lys Ala Lys Glu Ile Val Glu Glu Gly Lys Ile Ala Ile

115 120 125

Arg Asn Ile Arg Arg Glu Ile Leu Lys Lys Ile Lys Glu Asp Gln Lys

130	135	140	
Glu Gly Leu Ile Pro Glu Asp Asp Ala Lys Arg Leu Glu Asn Glu Ile			
145	150	155	160
Gln Lys Leu Thr Asp Glu Phe Ile Glu Lys Leu Asp Glu Val Phe Glu			
	165	170	175
Ile Lys Lys Glu Glu Ile Met Glu Phe			
180	185		

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C07K 14/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C07K 14/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WIP (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Nelson, K. E. et al. "Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of <i>Thermotoga maritima</i> ", NATURE (May, 1999) Vol. 399, No. 6734 P. 323-329	1-51
X	WO, 98/37202, A1 (KAJI, Akira) 27.8月. 1998 (27.08.98) ファミリーなし	1-51

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
28.08.00

国際調査報告の発送日
05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
六笠 紀子 印
4 B 9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Kanai, T. et al. "A regulatory factor, Fillp, involved in derepression of the isocitrate lyase gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Eur. J. Biochem. (1998) Vol. 256, No. 1 P. 212-220	1-51
P, X	Selmer, M. et al. "Crystal structure of <i>Thermotoga maritima</i> ribosome recycling factor: A tRNA mimic", SCIENCE (Dec. 1999) Vol. 286 P. 2349-2352	1-51
P, X	Selmer, M. et al. "Crystallization and preliminary X-ray analysis of <i>Thermotoga maritima</i> ribosome recycling factor", Acta Cryst. (Dec. 1999) Vol. 55, No. 12 P. 2049-2050	1-51
P, X	JP, 2000-86696, A (梶 昭) 28. 3月. 2000 (28. 03. 00) ファミリーなし	1-51
P, X	JP, 2000-157275, A (中村 義一) 13. 6月. 2000 (13. 06. 00) ファミリーなし	1-51
P, A	Yun, J. et al. "Crystallization and preliminary crystallographic studies of ribosome recycling factor from <i>Escherichia coli</i> ", Acta Cryst. (Jan. 2000) Vol. 56, No. 1 P. 84-85	1-51
P, A	Kashimori, H. et al. "Letter to the Editor: Backbone NMR assignment and secondary structure of Ribosome Recycling Factor (RRF) from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ", Journal of Biomolecular NMR (Dec. 1999) Vol. 15, No. 4 P. 341-342	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 14/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K 14/37, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WIP (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nelson, K.E. et al., "Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of <i>Thermotoga maritima</i> ", NATURE (May 1999), Vol.399, No.6734, pp.323-329	1-51
X	WO, 98/37202, A1 (KAJI, Akira), 27 August, 1998 (27.08.98) (Family: none)	1-51
X	Kanai, T. et al., "A regulatory factor, Fillp, involved in derepression of the isocitrate lyase gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Eur.J.Biochem. (1998) Vol.256, No.1 pp.212-220	1-51
P,X	Selmer, M. et al., "Crystal structure of <i>Thermotoga maritima</i> ribosome recycling factor: A tRNA mimic", SCIENCE (December 1999), Vol.286, pp.2349-2352	1-51
P,X	Selmer, M. et al., "Crystallization and preliminary X-ray analysis of <i>Thermotoga maritima</i> ribosome recycling factor", Acta Cryst. (December 1999), Vol.55, No.12, pp.2049-2050	1-51



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 August, 2000 (28.08.00)Date of mailing of the international search report
05 September, 2000 (05.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03639

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JP, 2000-86696, A (Akira KAJI), 28 March, 2000 (28.03.00) (Family: none)	1-51
P,X	JP, 2000-157275, A (Giichi NAAKMURA), 13 June, 2000 (13.06.00) (Family: none)	1-51
P,A	Yun, J. et al., "Crystallization and preliminary crystallographic studies of ribosome recycling factor from Escherichia coli", Acta Cryst. (January 2000), Vol.56, No.1, pp.84-85	1-51
P,A	Kashimori, H. et al., "Letter to the Editor: Backbone NMR assignment and secondary structure of Ribosome Recycling Factor (RRF) from Pseudomonas aeruginosa", <i>Journal of Biomolecular NMR</i> (December 1999), Vol.15, No.4, pp.341-342	1-51

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP00/03639

RECEIVED

AUG. 16. 2000

KUZUWA & PARTNER

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KUZUWA, Kiyoshi
Patent Attorneys, Kuzuwa & Partner
Sogo Kojimachi Dai-ichi Bldg.
2, Kojimachi 3-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0083
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 03 August 2000 (03.08.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PCT-1741/KJ	
International application No. PCT/JP00/03639	International filing date (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 04 June 1999 (04.06.99)
Applicant KAJI, Akira et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
04 June 1999 (04.06.99)	11/158637	JP	27 July 2000 (27.07.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Taïeb Akremi

Telephone No. (41-22) 338.83.38

